



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

CENTRO TECNOLÓGICO

DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E ENGENHARIA DE
ALIMENTOS

**INFLUÊNCIA DA ATMOSFERA MODIFICADA NO CRESCIMENTO
BACTERIANO EM OSTRAS**
(Crassostrea gigas)

Ana Paula Thiede Zimann

Florianópolis

2017

ANA PAULA THIEDE ZIMANN

**INFLUÊNCIA DA ATMOSFERA MODIFICADA NO CRESCIMENTO
BACTERIANO EM OSTRAS**
(Crassostrea gigas)

Trabalho de Conclusão do Curso de Graduação em Engenharia de Alimentos, Departamento de Engenharia Química e de Alimentos do Centro de Tecnologia da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do Título de Bacharel em Engenharia de Alimentos.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Alcilene Rodrigues Monteiro

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Deise Helena Baggio Ribeiro

Florianópolis

2017

Aos meus pais, Elias e Juliane, dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente aos meus pais, Elias Joel Zimann e Juliane Maria Thiede Zimann, pelo amor e carinho incondicional, pela minha educação e por não medirem esforços para tornar os sonhos de nossa família realidade.

Ao meu irmão, Felipe Joel Zimann, pela nossa amizade e companheirismo, pelas conversas, pelo exemplo e ensinamentos durante a minha vida.

Ao meu namorado, Luiz Fernando Pereira Nunes Junior, por todo o amor e cuidado, por me incentivar a melhorar continuamente, pela paciência, pela vibração em cada pequena conquista e por tornar meus dias mais felizes.

A toda a minha família e amigos, que mesmo perto ou longe, sempre estão presentes, dispostos a conversar e me dar forças para continuar.

Agradeço à minha orientadora Alcilene Rodrigues Monteiro, pela confiança e por todo apoio prestado desde o primeiro semestre da minha graduação.

À minha coorientadora, Deise Helena Baggio Ribeiro, por ser o exemplo, que me motivou a seguir o caminho da microbiologia para a vida. Pela paciência e vontade de ensinar, por me guiar para novos horizontes e pela nossa amizade. Toda a minha gratidão.

À Betina Luiza Koop, pelo que aprendemos juntas e pelos momentos compartilhados no laboratório, muito obrigada.

Agradeço à Universidade Federal de Santa Catarina, à CAPES e ao CNPq, pelo suporte financeiro e ensino de qualidade.

Agradeço ao universo pela vida e pela minha saúde.

*“Todo saber é em vão, exceto quando há trabalho.
E todo trabalho é vazio, exceto quando há amor”.*

- Khalil Gibran

RESUMO

A embalagem em atmosfera modificada é um método de conservação de alimentos bastante utilizado em algumas matrizes alimentícias, no entanto pouco sabe-se sobre seu efeito quando aplicado em ostras. Por serem animais que obtêm sua alimentação pela filtração da água, a microbiota natural das ostras (*Crassostrea gigas*) é bastante complexa e variável, sendo necessário tecnologias que prolonguem a vida de prateleira deste produto altamente perecível. O presente estudo avaliou o efeito da embalagem em atmosfera modificada composta por 80% N₂ – 20% CO₂ e 100% CO₂ em ostras cozidas armazenadas a 4 °C, sobre o crescimento de bactérias mesófilas e psicotróficas. Além da eficácia do tratamento térmico na inativação de *Vibrio* ssp. A metodologia para as análises microbiológicas seguiram o *Compendium of Methods for Microbiological Examination of Foods* de 2001 e 2015. A embalagem de concentração de CO₂ mais elevada (100%) demonstrou efeito bacteriostático mais pronunciado sobre as bactérias mesófilas e psicotróficas, aumentando a vida de prateleira em 2,8x quando comparado ao tratamento com menor concentração (20%). O tratamento térmico de 100 °C por 15 minutos foi capaz de inativar as células de *Vibrio* ssp. detectados na amostra *in natura*. A alteração dos valores de pH das amostras foram diretamente relacionadas com o desenvolvimento microbiano. A atmosfera modificada mostrou ser uma tecnologia viável para aplicação em ostras quanto aos aspectos microbiológicos.

Palavras-chave: Ostra. Atmosfera modificada. Análise microbiológica.

ABSTRACT

Modified atmosphere packaging is a preserving method for food. However, its influence on oysters is little studied. As filter-feeding bivalves, the natural microbiota of oysters (*Crassostrea gigas*) is complex and variable, requiring technologies that prolong the shelf life of this perishable product. The aim was to study the effect of the modified atmosphere packaging with 80% N₂ - 20% CO₂ and 100% CO₂ on the growth of mesophilic and psychrotrophic bacterias, in cooked oysters stored at 4 ° C as well as effectiveness of the heat treatment to inactivate *Vibrio* spp.. Microbiological analysis followed the 2001 and 2015's Compendium of Methods for Microbiological Examination of Foods. Higher CO₂ (100%) concentration inside the package has shown better bacteriostatic effect on the mesophilic and psychrotrophic bacterias, increasing the shelf life in 2.8 times when compared to mixed CO₂ concentration (80% N₂ – 20% CO₂). Heat treatment at 100 ° C for 15 minutes was able to inactivate *Vibrio* spp. detected in raw oysters. Changes in pH are associated to microbiological development. The modified atmosphere has demonstrated to be a viable technology for application in oysters regarding microbiological aspects.

Keywords: Oyster. Modified Atmosphere. Microbiological Analysis.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 – Evolução do crescimento de bactérias mesófilas nas amostras de ostras acondicionadas em ar atmosférico, 80% N ₂ – 20% CO ₂ e 100% CO ₂ | 47 |
| Figura 2 – Evolução dos valores de pH das ostras nas embalagens contendo 80% N ₂ – 20% CO ₂ e 100% CO ₂ | 49 |
| Figura 3 – Evolução da composição gasosa no <i>headspace</i> das embalagens contendo 80% N ₂ – 20% CO ₂ e 100% CO ₂ | 50 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 – Contagem microbiológica de bactérias mesófilas e psicrotróficas totais para ostras acondicionadas em atmosfera modificada composta por 100% CO ₂ | 44 |
| Tabela 2 – Contagem microbiológica de bactérias mesófilas e psicrotróficas totais para ostras acondicionadas em atmosfera modificada composta por 80% N ₂ – 20% CO ₂ | 46 |
| Tabela 3 – Contagem microbiológica de bactérias mesófilas e psicrotróficas totais na embalagem composta por ar atmosférico..... | 47 |

SUMÁRIO

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 11 |
| 1.1 | OBJETIVOS..... | 12 |
| 1.1.1 | Objetivo Geral | 12 |
| 1.1.2 | Objetivos Específicos..... | 13 |
| 2 | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 14 |
| 2.1 | PRODUÇÃO DE OSTRAS | 14 |
| 2.2 | COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA E VALOR NUTRICIONAL DA OSTRAS..... | 15 |
| 2.3 | CARACTERIZAÇÃO DA OSTRAS (<i>Crassostrea gigas</i>)..... | 17 |
| 2.4 | COMPOSIÇÃO MICROBIOLÓGICA DAS OSTRAS | 19 |
| 2.4.1 | Legislação | 23 |
| 2.4.2 | <i>Enterobacteriaceae</i> | 24 |
| 2.4.2.1 | <i>Salmonella</i> | 25 |
| 2.4.3 | <i>Staphylococcus</i> | 26 |
| 2.4.4 | <i>Vibrio spp.</i> | 27 |
| 2.4.4.1 | <i>Vibrio parahaemolyticus</i> | 28 |
| 2.5 | DETERIORAÇÃO DAS OSTRAS..... | 30 |
| 2.5.1 | Parâmetros que afetam o crescimento microbiano | 31 |
| 2.5.2 | pH..... | 31 |
| 2.5.3 | Temperatura de armazenamento..... | 33 |
| 2.5.4 | Alterações causadas por micro-organismos em ostras | 34 |
| 2.6 | ACONDICIONAMENTO SOB ATMOSFERA MODIFICADA | 35 |
| 3 | MATERIAS E MÉTODOS | 40 |
| 3.1 | Preparo das Amostras | 40 |
| 3.2 | Acondicionamento em Atmosfera Modificada | 40 |
| 3.3 | Análises Microbiológicas | 41 |
| 3.3.1 | Contagem total de micro-organismos mesófilos | 41 |

| | | |
|-------|---|-----------|
| 3.3.2 | Contagem total de micro-organismos psicrotróficos | 42 |
| 3.3.3 | Análise presuntiva de <i>Vibrio</i> ssp. | 43 |
| 4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 44 |
| 4.1 | Avaliação microbiológica das ostras acondicionadas em 100% de CO ₂ | 44 |
| 4.2 | Avaliação microbiológica das ostras acondicionadas em 80% de N ₂ - 20% de CO ₂ | 45 |
| 4.3 | Avaliação microbiológica das ostras acondicionadas em ar atmosférico | 46 |
| 4.4 | Análise presuntiva de <i>Vibrio</i> ssp. | 48 |
| 4.5 | Correlação entre os parâmetros pH, composição gasosa e crescimento microbiológico..... | 48 |
| 5 | CONCLUSÃO | 52 |
| 6 | SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS..... | 53 |
| 7 | REFERÊNCIAS | 54 |

1 INTRODUÇÃO

A espécie *Crassostrea gigas* é o molusco bivalve mais cultivado e consumido no Brasil e no mundo (AZEVEDO, 2011; FAO, 2011). Contudo, por serem animais filtradores possuem uma alta carga microbiana, em geral, refletindo a qualidade da água de onde se desenvolvem. O controle microbiológico dessas águas junto com novas técnicas de processamento são essenciais para um produto final de boa qualidade microbiológica e também para a conservação de suas características sensoriais.

A atmosfera modificada é um método que altera a composição da fase gasosa da embalagem, retardando, simultaneamente, deteriorações químicas e o crescimento microbiológico. É uma técnica aplicada para embalar alimentos refrigerados, frescos ou processados, com limitada vida de prateleira, como é o caso das ostras. Os principais gases utilizados para compor a atmosfera modificada são o dióxido de carbono (CO_2), oxigênio (O_2) e o nitrogênio (N_2), cada qual exerce diferentes funções sobre o produto e suas proporções são definidas de acordo com o tipo de alimento embalado. A estratégia da embalagem em atmosfera modificada é retardar o crescimento dos micro-organismos deteriorantes e patogênicos presentes, a partir da diminuição da concentração de O_2 e de elevação dos níveis de CO_2 , o qual possui efeito inibidor do crescimento bacteriano, também chamado de efeito bacteriostático. A dissolução do CO_2 no alimento, dependente de fatores intrínsecos da matriz como pH, teor de lipídeos, umidade, concentração de NaCl e extrínsecos como, temperatura, relação entre volume de gás e volume de produto (g/p), concentração inicial de CO_2 na fase gasosa, entre outros (SUBRAMANIAM, 1998; DEVLIEGHERE et al. 1998a, 1998b; LEON, 1999; JAKOBSEN, BERTELSEN, 2004; SIVERTSVIK et al. 2004a, 2004b; SIVERTSVIK, BIRKELAND, 2006; ROTABAKK et al. 2008a, 2008b).

O hábito de consumir a ostra viva restringe o comércio desse produto, devendo ser consumido em até 4 dias quando mantido sob refrigeração adequada. O comércio brasileiro de ostras vivas é direcionado, principalmente, por restaurantes, possuindo uma capacidade de absorção de apenas 3.000 toneladas por ano. Acima dessa quantidade, as possibilidades de venda diminuem, aumentando a concorrência entre os produtores. Como consequência, o preço de venda diminui, atingindo valores próximos ao custo da produção. Uma solução é desenvolver o comércio de ostras processadas, elevando o tempo de vida útil e permitindo o comércio em outros setores, como em supermercados (SANTOS, 2016).

O comércio de ostras processadas permitirá a retirada de toda a safra no momento mais apropriado, evitando a mortalidade que acontece no verão. Além de possibilitar a estocagem da produção, evitaria também a exposição das ostras às intempéries do tempo como a maré vermelha e a presença da Toxina Paralisante (PSP) nas águas de cultivo, dessa forma, não ocorreriam lacunas no fornecimento do produto, tornando a produção de ostra mais atrativa para os maricultores e a possibilidade de uma cadeia produtiva (SANTOS, 2016).

Considerando que as ostras (*Crassostrea gigas*) são geralmente consumidas *in natura*, sem cozimento prévio ou pouco cozidas, juntamente com o elevado conteúdo de água e por possuírem uma alta e diversa microbiota natural, este alimento é considerado de alto risco, altamente perecível e amplamente associado a intoxicações e infecções alimentares. Devido sua curta vida de prateleira e sendo um meio propício para o desenvolvimento de micro-organismos, torna-se de extrema importância para aumento de mercado, o desenvolvimento de processos que possam garantir a segurança alimentar dos consumidores, necessitando de mecanismos que reduzam a carga microbiana natural e que evitem o desenvolvimento de micro-organismos possivelmente sobreviventes ao tratamento térmico (PORTELLA, 2005; RAMOS, 2007; MIOTTO, 2012).

Tecnologias que propiciem a extensão da vida útil de produtos altamente perecíveis, como as ostras, com segurança, são de grande importância econômica por razões que incluem a possibilidade de transporte a longas distâncias, novos mercados consumidores, redução de perdas devido a deterioração e a conveniência para as indústrias, restaurantes e consumidores (GENIGEORGIS, 1985).

A utilização de processos como a embalagem em atmosfera modificada, surge como alternativa aos métodos convencionais utilizados na indústria de alimentos, buscando garantir a qualidade microbiológica das ostras, aumentando sua vida útil e preservando suas características físico-químicas e sensoriais.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

O objetivo principal deste trabalho foi estudar o efeito do acondicionamento de ostras (*Crassostrea gigas*) em atmosfera modificada e avaliar o impacto desse processo no crescimento de bactérias deteriorantes.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Avaliar se o tratamento térmico aplicado foi eficaz para a inativação de *Vibrio* spp.
- Estudar o efeito bacteriostático de duas concentrações de CO₂ (80% N₂ – 20% CO₂ e 100% CO₂) sobre o desenvolvimento de bactérias mesófilas e psicrotróficas durante o período de estocagem a 4 °C, utilizando o acondicionamento em ar atmosférico como controle.
- Comparar a alteração do pH das ostras com o desenvolvimento microbiano.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PRODUÇÃO DE OSTRAS

O ser humano pratica a aquicultura há mais de quatro mil anos para suprir suas necessidades alimentícias (VINATEA, 1999). Sendo o consumo de ostras considerado uma das formas mais antigas de extração marinha (SANTOS, 1978). O cultivo de moluscos no mundo ocidental se iniciou desde a época do Império Romano, onde se produziam, cozinhavam ou extraíam o óleo comestível e transportavam por mar da Itália até a península ibérica. A partir do século XV, o transporte e comercialização já era regular entre diversas regiões da Europa e o aumento do consumo, na primeira metade do século XX, levou à implementação dos cultivos de forma comercial (BARROSO, POERSCH e CAVALLI, 2007).

Devido à superexploração dos oceanos, pela atividade extrativista, os volumes de produção estão reduzindo em todo o mundo. De tal modo, pela atual necessidade de aumento na produção de alimentos, o mar não deve ser visto apenas como um local de retirada e coleta, mas como uma área fértil para a produção de alimentos (ANDRADE, 2016). Segundo a Organização das Nações Unidas para Alimentação e a Agricultura (2013), a produção de moluscos, ocupa a segunda posição na porcentagem de espécies produzidas, perdendo somente para a produção de peixes.

O cultivo de moluscos marinhos é denominado malacocultura e de ostras ostreicultura. Essa atividade tem grande importância em países de extenso litoral, devido aos baixos custos de produção e pela rentabilidade satisfatória. Destacando-se como maiores produtores mundiais a China, Espanha, Nova Zelândia, Chile, Japão, Coreia, Itália e o Brasil (SOUZA FILHO, 2003; FAO, 2011).

No Brasil, o cultivo de ostras e mexilhões é a fração mais importante da malacocultura, sendo o estado de Santa Catarina o líder nacional na produção de moluscos bivalves e o segundo maior produtor da América Latina. A ostreicultura também é desenvolvida nos estados do Rio de Janeiro, São Paulo e Espírito Santo (FERREIRA; OLIVEIRA NETO, 2006; FAO, 2016).

O estado de Santa Catarina é o maior produtor de ostras e mexilhões de cultivo do Brasil, responsável por mais de 90% da produção nacional (SOUZA; PETCOV, 2013). Sua costa reúne condições ideais para o cultivo desses animais, como baías, enseadas e estuários,

regiões com temperaturas e qualidade de água adequadas e ricas em fitoplâncton, dos quais as ostras se alimentam (SANTOS et al. 2014).

Em Santa Catarina, são encontradas em torno de 700 fazendas marinhas que fazem a retirada dos moluscos diariamente. Os produtores estão distribuídos em 12 municípios do litoral, entre a cidade de Palhoça e São Francisco do Sul. A comercialização catarinense de ostras (*Crassostrea gigas*) na safra de 2015 foi de 3.030,26 toneladas (SOUZA; PETCOV, 2013; SANTOS; COSTA, 2016).

A espécie *Crassostrea gigas* ocupa papel de destaque, devido ao seu potencial de crescimento rápido e a sua ampla tolerância a diferentes condições ambientais (PANORAMA DA AQUICULTURA, 2001; FAO, 2010). Quando comparadas às espécies nativas, conferem maior quantidade de carne e, conseqüentemente, maior rendimento (POLI, 2004).

No início, a ostreicultura foi visualizada apenas como uma alternativa para os pescadores artesanais, mas, com o decorrer dos anos, passou a representar a principal fonte de renda (SOUZA FILHO, 2003). As fazendas marinhas de ostras, além de sua importância econômica para a região, são geradoras da preservação ambiental, pois a qualidade dos moluscos está intimamente ligada a qualidade da água de onde são cultivados (POLI, 2004). Dessa forma, alimentos procedentes do ambiente marinho desempenham um importante papel na cadeia de fornecimento de alimentos, promovendo uma ligação entre ecossistemas saudáveis, desenvolvimento econômico e bem-estar humano (SUBASINGHE, 2014).

2.2 COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA E VALOR NUTRICIONAL DA OSTRÁ

A composição bioquímica e o valor nutricional da ostra é influenciada por diversos fatores, como: temperatura, qualidade e quantidade de fitoplâncton, presença de poluentes ambientais, fase do ciclo reprodutivo e da distribuição das reservas metabólicas nas diferentes fases de crescimento e reprodução, possuindo assim uma variação sazonal (DESLOUS-PAOLI; HÉRAL, 1988; REN et al. 2003; ORBAN et al. 2004).

A água é o principal constituinte da ostra, representado cerca de 82% do seu corpo (USDA, 2016). A quantidade de água presente na ostra depende do ciclo reprodutivo, aumentando sua concentração na desova (MURRAY; BURT, 2001).

As ostras fornecem proteínas de alto valor biológico, possuindo quantidades significativas de aminoácidos, como a glicina (KIMURA, OHMINAMI e OKUDA, 1998). Os níveis de proteína variam durante as estações do ano, apresentando um aumento na primavera,

período no qual ocorre a gametogênese e atingem níveis mínimos no final do verão, início da desova (DESLOUS-PAOLI; HÉRAL, 1988; DRIDI, ROMDHANE; ELCAFSI, 2007; LI et al. 2009; COUTINHO, 2012).

Os lipídeos, também apresentam maiores concentrações no final da primavera, onde encontram-se acumulados nas gônadas. No verão quando a temperatura da água aumenta ocorrendo a desova, os teores de lipídeos diminuem, devido ao elevado gasto energético dos gametas (DESLOUS-PAOLI; HÉRAL, 1988; DRIDI, ROMDHANE e ELCAFSI, 2007).

De acordo com Parisenti, Tramonte e Arellano (2010), quando comparadas ostras do gênero *Crassostrea gigas* cultivadas em Florianópolis no verão e primavera, constatou-se que em ambas as estações o teor de lipídios foi considerado baixo, sendo maior na primavera (2,7 g / 100 g) do que no verão (1,5 g / 100 g).

Os carboidratos nas ostras se encontram basicamente sob a forma de glicogênio. Estudo realizado por Caetano (2006), demonstrou que as ostras *Crassostrea gigas*, cruas, cultivadas em Florianópolis – SC, no período do verão possuem em 100 g: 60,46 kcal; 6,37 g de proteínas; 5,28 g de carboidratos; 1,54 g de lipídeos.

As ostras estão entre os alimentos com as maiores concentrações de zinco e também são consideradas boas fontes de ferro (KIMURA, OHMINAMI e OKUDA, 1998; WAY, 2000; PEDROSA; COZZOLINO, 2001; COZZOLINO, 2005). De acordo com Caetano (2006), as ostras *Crassostrea gigas*, cruas, cultivadas na região de Florianópolis, SC apresentaram 4,38 mg de zinco em 100 gramas.

De acordo com o *United States Department of Agriculture Agricultural* (2017), ostras cozidas ao vapor possuem em 100 g: 163 kcal, 18,9 g de proteínas, 4,6 g de lipídios, dos quais, 1,02 g são saturados, 0,776 g são monoinsaturados, 1,788 g são poli-insaturados e 100 mg colesterol. Possuem também 9,9 g de carboidratos, 16 mg de cálcio (Ca), 9,2 mg de ferro (Fe), 44 mg de magnésio (Mg), 243 mg de fósforo (P), 302 mg de potássio (K), 212 mg de sódio (Na) e 33,24 mg de zinco (Zn). Das vitaminas em 100 g possuem: 12,8 mg de vitamina C; 0,127 mg de tiamina; 0,443 mg de riboflavina; 3,618 mg de niacina; 0,09 mg de vitamina B6; 28,8 µg de vitamina B12, 146 µg de vitamina A, 0,85 mg de vitamine E e 0,1 µg de vitamina K.

2.3 CARACTERIZAÇÃO DA OSTRÁ (*Crassostrea gigas*)

Conhecida como “ostra do Pacífico” ou “ostra japonesa”, a espécie *Crassostrea gigas*, pertence ao reino Animalia, filo Mollusca, classe Bivalvia, ordem Ostreoida, família Ostreidae, gênero *Crassostrea* (THUNBERG, 1793).

Sua anatomia é dividida em concha e corpo. A concha possui duas partes (valvas), por esse motivo são classificadas como moluscos bivalves. Uma concha direita ou superior, mais plana e outra esquerda ou inferior mais côncava, por onde o animal se fixa no substrato. A conexão entre as valvas é feita por um ligamento e pelo músculo adutor, que fecha a concha quando se contrai. A concha é constituída, principalmente, por carbonato de cálcio, extraído da água do mar por células especializadas localizadas no manto e tem como função proteger o corpo (QUEIROZ, 1990; RUPP, 1999; FARIAS, 2008; SEBRAE, 2015).

A parte mole do molusco é denominado de corpo, o qual se encontra alojado na cavidade intervalval. É constituído por manto, brânquias, palpos labiais, coração e massa visceral, a qual é composta por órgãos do aparelho digestivo, reprodutor e excretor. Possuem brânquias bem desenvolvidas, responsáveis pela respiração e pela filtração de alimentos (QUEIROZ, 1990; FARIAS, 2008).

O manto recobre todas as partes moles da ostra, com exceção do músculo adutor. Assim como as brânquias, o manto também é capaz de se movimentar, fazendo a água circular por dentro da concha carregando seu alimento. Além de conter as células responsáveis pela formação da concha, o manto também apresenta funções sensoriais (BARNES, 1984; SEBRAE, 2015).

As ostras (*Crassostrea gigas*) são espécies larvíparas ou incubatórias, ocorrendo fecundação interna e parte do desenvolvimento larval dentro da cavidade palial do corpo, posteriormente as larvas são liberadas na água. Não existe dimorfismo sexual, ou seja, os sexos só podem ser diferenciados pelo tipo de gameta produzido pela ostra, podendo variar o sexo em cada desova (QUEIROZ, 1990).

Os ovos são liberados na água e deles saem larvas chamadas de trocóforas, as quais são levadas pelas correntes e pelas marés e, enquanto crescem e se desenvolvem. Após, aproximadamente, duas semanas na água as larvas estão prontas para se fixarem em um objeto limpo e firme, preferindo substratos como madeira, ferro ou rocha para se aderirem. Após esse processo são chamadas de sementes e já possuem o formato normal de uma ostra (QUEIROZ, 1990; SEBRAE, 2015).

O cultivo de ostras no Brasil depende exclusivamente da produção de sementes em laboratório. O único produtor no país é o Laboratório de Cultivo de Moluscos Marinhos (LCMM) da Universidade Federal de Santa Catarina, onde a reprodução e o desenvolvimento das larvas são realizados num processo reprodutivo induzido e controlado (GOMES, 1986; QUEIROZ, 1990; SOUZA FILHO, 2003).

As ostras (*Crassostrea gigas*) se desenvolvem em águas com temperaturas de 4 a 24 °C, sendo entre 15 a 19 °C a faixa ideal para o melhor crescimento (WALNE, 1979). A gama de salinidade ótima é de 18 a 32 ppm, podendo ser realizado em salinidade inferior ou superior, porém o desenvolvimento torna-se mais demorado (PEREIRA, VIANA e RODRIGUES, 2004).

O tamanho comercial da espécie *Crassostrea gigas* é de 8 cm, atingido esta dimensão após 7 a 8 meses de cultivo, devido às condições encontradas no litoral de Santa Catarina (MIZUTA, 2010). A maior perda na produção é registrada nos meses de verão, geralmente após a desova, quando ocorre o máximo desenvolvimento do tecido reprodutivo e as condições de temperatura da água estão elevadas, geralmente acima de 23 °C (IMAI, 1982).

O mecanismo de alimentação das ostras é um processo de separação ativa, onde partículas orgânicas de diferentes tamanhos são capturadas, e o que não serve como alimento é rejeitado e excretado. A água contendo seu alimento entra pelas valvas abertas e passa pelas brânquias. Os cílios existentes nas brânquias são responsáveis por conduzirem essas partículas até os palpos labiais, selecionando-as por tamanho, as grandes demais ficam aderidas ao muco e são expulsas para fora da concha, recebendo o nome de pseudofezes. Apenas as partículas menores conseguem passar pelos palpos labiais e são transportadas até a boca, digeridas no estômago e absorvidas pelo intestino. O material não aproveitado (fezes) é eliminado pelo ânus (QUEIROZ, 1990; BEECHAM, 2008; SEBRAE, 2015).

As ostras fazem circular grandes quantidades de água no interior de sua concha, através dos movimentos respiratórios de suas brânquias. Segundo a *International Commission on Microbiological Specifications for Foods* (1985), uma única ostra pode filtrar acima de 10 litros de água por hora, absorvendo ao mesmo tempo todas as partículas em suspensão existentes, como fitoplâncton, zooplâncton e detritos (QUEIROZ, 1990; PEREIRA et al. 2006).

Por serem organismos filtradores podem absorver e concentrar também os contaminantes existentes na água de onde são cultivadas. Poluentes de origem química como, resíduos químicos de agrotóxicos, medicamentos veterinários ou metais pesados.

Contaminantes biológicos associados à: infecções por trematódeos, florações de algas marinhas tóxicas, bactérias patogênicas e vírus (FELDHUSEN, 2000; CARTER, 2005).

Com o aumento da população próximo aos locais de cultivo, como é o caso de Florianópolis, e, conseqüentemente, o aumento do descarte de esgoto nas águas litorâneas, aumentou-se a detecção de patógenos bacterianos e virais tanto nas águas de cultivo como nos próprios animais (SOUZA et al. 2014). Sendo que a concentração de micro-organismos pode ser maior nas ostras do que nas águas de cultivo e, deste modo, a ausência de contaminação na água de cultivo num dado momento pode não corresponder à ausência de contaminação nas ostras ali cultivadas (LENOCH, 2003; BUTT, ALDRIDGE e SANDERS, 2004).

Segundo Feldhusen (2000), as bactérias patogênicas frequentemente associadas às doenças causadas pelo consumo de moluscos marinhos contaminados, podem ser divididas em três grupos, conforme a fonte de contaminação:

- Bactérias naturalmente presentes no ecossistema aquático: *Aeromonas hydrophila*, *Clostridium botulinum*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio vulnificus* e *Listeria monocytogenes*;
- Bactérias presentes no ambiente aquático devido à contaminação fecal humana e de animais de sangue quente: *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Shigella* spp., *Campylobacter* spp.
- Bactérias provenientes da manipulação e do processamento: *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus*.

Deste modo, as características microbiológicas dos moluscos, variam de acordo com a localizações geográfica do cultivo, temperatura e salinidade da água, distância entre o local de cultivo e áreas poluídas, método de produção, práticas de manejo, condições ambientais e procedimentos pós-colheita (FELDHUSEN, 2000).

2.4 COMPOSIÇÃO MICROBIOLÓGICA DAS OSTRAS

Os moluscos bivalves obtêm seu alimento pela filtração de pequenas partículas existentes na água, podendo concentrar em seu trato digestório contaminantes bióticos e abióticos presentes no ambiente marinho (BEIRÃO, TEIXEIRA e MEINERT, 2000).

Os alimentos são atacados por enzimas desde o momento em que penetram nos condutos da glândula digestiva. Apesar disso, é possível detectar células vivas presentes no estômago das ostras até seis horas após a ingestão e durante oito a dezesseis horas no intestino

(BARNABÉ, 1996). Portanto, as bactérias que estejam eventualmente presentes na água de cultivo, após serem filtradas, poderão permanecer viáveis no trato digestivo das ostras (MORAES et al. 2000).

Em geral, a composição microbiológica das ostras reflete a água onde esses animais vivem, onde a microbiota bacteriana natural da água marinha é predominantemente Gram-negativa (JAY, 2005). Composta, principalmente, por bactérias do gênero *Pseudomonas* e da família *Vibrionaceae*, ambas Gram-negativas (GRAM; HUSS, 1996; HUSS, 1997; CAO, XUE e LIU, 2009).

No entanto, a contaminação das águas costeiras tem influência direta sobre a qualidade dos organismos aquáticos. Patógenos podem viver naturalmente no ambiente marinho, como é o caso das espécies de vibrios, mas também podem ser decorrentes da contaminação das águas de estuários e de ambientes costeiros por material fecal de origem humana e/ou animal (YOUNGER, LEE e LEES, 2003).

Situação que se agrava quando ocorre o aumento da temperatura da água, uma vez que as taxas de filtração e de crescimento das ostras também são aceleradas nessas condições (GONZALEZ-ACOSTA et al. 2006; CHRISTO, 2006; SHEN et al. 2009).

O principal grupo de micro-organismos utilizados como indicadores de contaminação são as bactérias. Dentre elas destaca-se a *Escherichia coli* e a *Salmonella* spp., como indicadores de contaminação do ambiente de cultivo por material fecal (FELDHUSEN, 2000) e o *Staphylococcus aureus*, como indicador de contaminação pós-manipulação humana (BARRETO, 2000; KUSUMANINGRUM et al. 2003).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (2004), 60% das doenças alimentares estão relacionadas com a refrigeração inadequada, falhas na higienização de instalações e equipamentos, manipuladores infectados, ocorrência de contaminação cruzada e uso de matérias-primas e produtos de qualidade duvidosa.

De modo geral, a microbiota bacteriana presente nas ostras reflete as condições da água de onde foram cultivadas, contudo, o método de coleta e as condições de armazenamento, transporte e manipulação também exercem grande influência sobre a qualidade sanitária das ostras (HUSS, 1997; GERMANO, GERMANO e OLIVEIRA, 1998; FELDHUSEN, 2000).

Para que as ostras sejam consideradas um alimento seguro, medidas de controle higiênico-sanitário devem ser realizadas por produtores e comerciantes, assim como o acompanhamento das condições químicas, físicas e microbiológicas do ambiente marinho de cultivo, manipulação correta após a extração, uso adequado da cadeia de frio e até mesmo

controle da qualidade da água e do gelo utilizados nos procedimentos (OGAWA; MAIA, 1999; PEREIRA, 2003; GALVÃO, 2004; SOUZA; PETCOV, 2013).

Quando retiradas da água as ostras permanecem vivas, protegendo-se dentro de suas conchas, sua conservação é garantida quando mantidas em baixas temperaturas e enquanto estiverem com suas valvas fechadas. Moluscos manejados de maneira inadequada podem morrer rapidamente, após a retirada da água, acarretando na deterioração e no rápido desenvolvimento de micro-organismos causadores de doenças (VIEIRA, 2004; SOUZA; PETCOV, 2013).

As ostras, apresentam um tempo de vida útil curto e variável em função de suas características intrínsecas. Os motivos são a alta diversidade da microbiota natural, composta por organismos psicrotróficos, os elevados índices de nitrogênio amoníaco livre, a alta atividade de água, o elevado conteúdo proteico, o pH neutro, e enzimas autolíticas, responsáveis pelo surgimento de odores e sabores desagradáveis no produto. Deste modo, as ostras, propiciaram um ambiente favorável ao desenvolvimento de micro-organismos, fatores os quais contribuem para uma rápida deterioração e para a veiculação de patógenos causadores de infecções e intoxicações alimentares (FDA, 2001; CODEX ALIMENTARIUS, 2004; CORDEIRO et al. 2007; MADIGAN et al. 2014).

A época de colheita foi documentada como um dos principais fatores responsáveis por diferentes composições da microbiota das ostra (PARVEEN et al. 2008; WANG et al. 2014; ROTERMAN et al. 2015). A diferença sazonal afeta a microbiota tanto das ostras frescas, assim como também determinará as bactérias deteriorantes dominantes (CHEN et al. 2016).

Além disso, as comunidades bacterianas foram correlacionadas com as espécies de ostra, com a microbiota da água do mar, com os locais de cultivo e com os estágios de desenvolvimento das ostras (PUJALTE et al. 1999; CAO et al. 2009; LA VALLEY et al. 2009; SHEN et al. 2009; AZANDÉGBÉ et al. 2012; KING et al. 2012; TRABAL et al. 2012; FERNÁNDEZ et al. 2014; MADIGAN et al. 2014; ROTERMAN et al. 2015; WOOD; ARIAS, 2015).

As microbiota em ostras *in natura* é diversa, acumulam diferentes tipos de micro-organismos, incluindo *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Aspergillus*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Dokdonella*, *Enterobacter* (*Enterobacteriaceae*), *Enterococcus*, *Flavobacterium*, *Firmicutes verrucomicrobia*, *Granulicella*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Mycoplasma*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Moraxella*, *Pseudomonas*,

Pseudoalteromonas, *Psychrilyobacter*, *Photobacterium*, *Shewanella*, *Staphylococcus*, *Vibrio* e *Weissella*. Além disso, também foram identificados fungos como o *Penicillium*, *Fusarium* e *Rhodotorula* (COLWELL; LISTON, 1960; HERNÁNDEZ-ZÁRATE; OLMOS-SOTO, 2006; ZUREL et al. 2011; CHEN et al. 2013; WANG et al. 2014; CHEN et al. 2016; CHEN et al. 2017).

Bactérias patogênicas como *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella*, *Aeromonas* spp., *E. coli*, *Listeria*, *Staphylococcus*, *Photobacterium*, *Shewanella* e *Plesiomonas* spp. são frequentemente isoladas de moluscos comercializados *in natura*. Os gêneros *Pseudomonas* e *Vibrio* são os principais causadores da deterioração de ostras (*Crassostrea gigas*) e são comumente detectados como bactérias de deterioração dominante durante o armazenamento sob refrigeração. O *Vibrio parahaemolyticus* e o gênero *Aeromonas* têm emergido como a maior causa de surtos de doenças relacionadas ao consumo de moluscos bivalves ao redor do mundo (RICHARDS et al. 2008; TEPLITSKI, WRIGHT e LORCA, 2009; CAO et al. 2009; LUCENA et al. 2012; MADIGAN et al. 2014; CHEN et al. 2016).

Foram isolados de ostras deterioradas, os seguintes gêneros de bactérias: *Serratia*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Clostridium*, *Bacillus*, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Shewanella*, *Lactobacillus*, *Flavobacterium* e *Micrococcus*. No início do desenvolvimento da deterioração, *Pseudomonas* e *Acinetobacter-Moraxella* ssp. foram as espécies que dominavam a microbiota, enquanto nos estágios mais avançados *Enterococcus*, *Lactobacillus* e leveduras foram dominantes (JAY, 2005).

A vida de prateleira da ostra pode ser afetada por diversos fatores, sendo os principais fatores extrínsecos, temperatura e atmosfera, como também fatores intrínsecos, que variam de espécie, tamanho, idade, saúde, composição e carga microbiana (LINTON, MC CLEMENTS e PATTERSON, 2003; CAO et al. 2010; CHEN et al. 2016). Entre esses fatores, a microbiota desempenha papel crítico em relação a deterioração e a segurança alimentar (CHEN et al. 2016).

Apesar de apresentarem uma microbiota diversa e específica para cada condição de desenvolvimento, as comunidades bacterianas das ostras apresentam um padrão de micro-organismos mais isolados.

Cruz-Romero (2008), documentou que a microbiota inicial em ostras *in natura* (*Crassostrea gigas*) do porto de Cork eram dominantes por *Aeromonas*, *Vibrio* e *Pseudomonas*. Cao, Xue e Liu (2009), obtiveram resultados semelhantes em ostras (*Crassostrea gigas*) do Mar Amarelo na China, onde *Pseudomonas* e *Vibrio* foram

identificados como os micro-organismos dominantes, que representavam 22% e 20% da microbiota total, respectivamente.

2.4.1 Legislação

O Ministério da Saúde por meio da Resolução RDC nº12 de 02 de janeiro de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), regulamenta padrões microbiológicos para alimentos, estabelecendo em moluscos bivalves *in natura* resfriados ou congelados, não consumidos cru, os limites máximos permitidos para *Estafilococos* coagulase positivo de até $1,0 \times 10^3$ UFC.g⁻¹ e ausência de *Salmonella* spp. em 25 g. O limite para coliformes a 45 °C é estabelecido apenas em moluscos bivalves cozidos, temperados ou não, industrializados resfriados ou congelados, sendo este de $5,0 \times 10$ NMP/g. A legislação estabelece valores limites específicos de *Vibrio parahaemolyticus* somente para pratos prontos à base de frutos do mar crus, sendo de $1,0 \times 10^3$ NMP/g (BRASIL, 2001).

Os limites máximos de contaminação bacteriana que a legislação brasileira estabelece, geralmente, não alteram a aparência física do fruto do mar, a razão de suas limitações está relacionada ao fato de serem organismos patógenos ao homem e não deteriorantes do produto (VIEIRA, 2004).

O ano de 2012 representou um importante marco para a regulamentação do controle higiênico-sanitário de bivalves no Brasil, até então não existia no País uma legislação específica que estabelecesse bases para o controle sanitário de moluscos bivalves, o controle era fundamentado na legislação para produtos de origem animal em geral (SOUZA et al. 2014).

Em 13 de abril de 2012, o Ministério da Pesca e Aquicultura publicou a Instrução Normativa nº 3, que instituiu a Rede Nacional de Laboratórios do Ministério da Pesca e Aquicultura, responsável pela realização de diagnósticos e análises oficiais. Em seguida, em 8 de maio de 2012, foi publicada a Instrução Normativa Interministerial nº 7, do Ministério da Pesca e Aquicultura e do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, que criou o Programa Nacional de Controle Higiênico-Sanitário de Moluscos Bivalves (PNCMB), o qual estabelece as diretrizes para o monitoramento e controle de micro-organismos contaminantes e biotoxinas marinhas em moluscos bivalves e também contempla os requisitos de inspeção industrial e sanitária dos estabelecimentos de processamento de moluscos bivalves, abrangendo as etapas de retirada, trânsito, processamento e transporte dos moluscos. Em 28

de junho de 2012, foi publicada a Portaria n° 204 do Ministério da Pesca e Aquicultura, que complementou o PNCMB, estabelecendo a metodologia de coleta de água e moluscos para análises microbiológicas e de biotoxinas. Em 15 de maio de 2013, o Ministério da Pesca e Aquicultura publicou a portaria n° 175, complementando a anterior com tabelas para interpretação dos resultados gerados pelo monitoramento (SOUZA et al. 2014).

A Instrução Normativa n° 7 determina o limite de número mais provável (NMP) para a bactéria *Escherichia coli* em 100 gramas da parte comestível dos moluscos bivalves, sendo este um dos critérios para retirada liberada dos moluscos das áreas de cultivo, o limite deve ser menor que 230 NMP. Outras bactérias patogênicas, como por exemplo, *Vibrio parahaemolyticus*, não são abordadas nesta legislação (CORTINA, 2015).

2.4.2 Enterobacteriaceae

A família *Enterobacteriaceae* abrange gêneros de bactérias na forma de bastonetes, Gram-negativas, aeróbicas e anaeróbicas facultativas, imóveis ou não (flagelos peritríquios), não esporogênicas, oxidase negativas e catalase positivas. Produzem ácido e reduzem o nitrato. O gênero *Escherichia* é formado por 4 espécies (EVANGELISTA, 1994).

As bactérias da família *Enterobacteriaceae*, como *Salmonella*, *Shigella* e *Escherichia coli* ocorrem em alimentos de origem marinha como decorrência da contaminação fecal e da poluição das águas, onde estes organismos podem sobreviver durante um longo período de tempo. Como também, em virtude da contaminação direta dos produtos durante o manejo e processamento (HUSS, 1997).

A *Escherichia coli* faz parte da microbiota intestinal do homem e de outros animais de sangue quente. Por esse motivo, tem sido usada como indicadora de contaminação de origem fecal. Por não fazer parte da biota natural marinha, a presença de *E. coli* está associada à contaminação da água do local de cultivo (BARROSO, POERSCH e CAVALLI, 2007). Assim sendo, a presença de *E. coli* em alimentos indica grande probabilidade de contaminação fecal recente e da possível presença de outros micro-organismos patogênicos entéricos (BRASIL, 2001; SOUZA; PETCOV, 2014).

A concentração dos micro-organismos nos moluscos filtradores varia de um animal para outro e depende de diversos fatores ambientais, como as condições meteorológicas, ventos, chuvas, marés, da temperatura, da quantidade de matéria total particulada (turbidez), fisiologia alimentar do molusco, local da produção e até mesmo o posicionamento dos indivíduos dentro dos sistemas de cultivo (HUSS, 1997; YOUNGER, LEE e LESS, 2003).

Em estudo realizado por Farias (2008), a qualidade da água de onde os animais foram cultivados não mostrou correlação significativa com os níveis de contaminação microbiana das ostras analisadas. Sendo assim, a análise microbiológica das ostras demonstra ser mais representativa do que as análises da água, como um instrumento de garantia da qualidade higiênico-sanitária desses animais.

As bactérias da família *Enterobacteriaceae*, como os coliformes a 45 °C e a *Escherichia coli* são utilizadas como indicadores da qualidade sanitária das águas de onde os moluscos são cultivados e dos próprios moluscos bivalves (BARARDI, SINCERO e CORREA, 2006).

Diversos estudos realizados em Santa Catarina investigaram os níveis de bactérias indicadoras de contaminação fecal nas águas dos locais de produção e nos moluscos cultivados. De maneira geral, os resultados indicam a presença de níveis críticos desses micro-organismos em regiões próximas aos centros urbanos (EPAGRI, 2009).

2.4.2.1 *Salmonella*

Entre os bastonetes Gram-negativos que causam gastroenterites de origem alimentar, os membros mais importantes pertencem ao gênero *Salmonella* (JAY, 2005).

O gênero *Samonella* pertence à família *Enterobacteriaceae*, são pequenos bastonetes Gram-negativos, móveis na maioria das vezes, por flagelos peritricos, aeróbicas, mesófilas e não-esporuladas. Retiram seus requerimentos de carbono de uma única fonte, o citrato. Geralmente, são incapazes de fermentar lactose e sacarose, porém a glicose e outros monossacarídeos podem ser fermentados com produção de gás. O pH ótimo de crescimento é próximo da neutralidade, entre 6,6 e 8,2 e a temperatura ideal de multiplicação é entre 35 e 37 °C (EVANGELISTA, 1994; JAY, 2005).

As *Salmonella* spp. são amplamente distribuídas na natureza, sendo o principal reservatório o trato intestinal do homem e de animais de sangue quente e frio, com exceção dos peixes, moluscos e crustáceos, os quais podem ser contaminados após a pesca ou extração (COSTA et al. 2007).

Ao contrário dos estafilococos, as salmonelas não toleram grandes concentrações de sais, mas são capazes de sobreviver e se multiplicar em ambientes de estuários (RHODES; KATOR, 1988), causando riscos de contaminação em ostras. Todavia, é a preparação e

manipulação inadequada dos alimentos que constituem o principal fator das causas de infecção alimentar por esses organismos (JAY, 2005).

2.4.3 *Staphylococcus*

A gastroenterite estafilocócica é causada pela ingestão de alimentos que contenham uma ou mais enterotoxinas, geralmente associadas ao *Staphylococcus aureus* coagulase e termonuclease positivos (JAY, 2005).

São tipicamente bactérias Gram-positivas, mesófilas, anaeróbias facultativas, com maior crescimento em condições aeróbias, quando, então, produzem catalase. Os estafilococos são bactérias mesófilas e apresentam temperatura de crescimento na faixa de 7 a 47,8 °C. O pH ótimo de crescimento é entre 6,0 - 7,0 e se desenvolvem na presença de NaCl. São capazes de tolerar até 20% de cloreto de sódio, possibilitando sua sobrevivência em alimentos de origem marinha, como as ostras (VIEIRA, 2004; JAY, 2005; FRANCO, 2008).

O *Staphylococcus aureus* causa um amplo espectro de doenças que variam de infecções cutâneas superficiais até doenças sistêmicas letais (BROOKS, BUTEL e MORSE, 2000). A cavidade nasal é o principal habitat dos estafilococos no homem, assim como a boca, pele e cabelos, a partir deste foco, atingem a epiderme e feridas, contaminando as mãos e as superfícies que tenham entrado em contato, atingindo ar, água, solo, esgoto e alimentos. Os surtos de intoxicação alimentar são potencialmente provocados por alimentos que permaneceram por tempo variável em temperaturas amenas (TORTORA, FUNKE e CASE, 2005; FRANCO, 2008).

Em geral, pode-se esperar a presença desse micro-organismo, mesmo que em pequenas quantidades, em todos os alimentos de origem animal ou naqueles diretamente manipulados, a não ser que tenha sido aplicado tratamentos térmicos para a destruição dos mesmos. O resfriamento rápido de toda a massa alimentícia é uma das medidas para a prevenção e controle desta intoxicação. É comum sua ocorrência em uma ampla variedade de alimentos que não sofreram tratamento térmico suficiente para sua destruição e sua presença em grande número costuma indicar práticas ineficientes de produção e higiene ou refrigeração inadequada após o preparo (BEIRÃO, TEIXEIRA e MEINERT, 2000; JAY, 2005; FRANCO, 2008).

2.4.4 *Vibrio* spp.

O gênero *Vibrio* pertence à família *Vibrionaceae*, as espécies que constituem o gênero são bacilos Gram-negativos, em forma de bastões retos ou curvos, não formadores de esporos, anaeróbicas facultativas e mesófilas (EVANGELISTA, 1994; MCLAUGHLIN, 1995; THOMPSON; SWINGS, 2006).

A maioria das espécies patogênicas possui flagelo polar simples, fermentam a glicose, sem produção de gás, são VP positivas, uréase negativa e catalase positiva. As espécies patogênicas, são majoritariamente mesófilas, isto é, ocorrem, em geral, em águas tropicais e em número mais elevado em águas temperadas no final do verão ou início do outono (EVANGELISTA, 1994; HUSS, 1997; KONEMAN et al. 2008).

O gênero *Vibrio* inclui mais de 30 espécies, das quais 14 são reconhecidas como patogênicas para o homem. Diferentes espécies do gênero *Vibrio* habitam naturalmente ambientes aquáticos, marinhos, costeiros e estuários, em regiões de clima tropical e temperado, e podem estar presentes em moluscos quando crus ou se submetidos à cocção insuficiente (GIBOTTO et al. 2000; BUTT, ALDRIDGE e SANDERS, 2004; WHO, 2005; IWAMOTO et al. 2010).

Dentre as espécies, destaca-se o *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* e *Vibrio cholerae*, os quais são potencialmente patogênicos ao homem, e responsáveis pela maioria das doenças transmitidas por alimentos (DTAs). A capacidade desses micro-organismos em causar gastroenterite humana está sobretudo associada ao consumo de moluscos *in natura* ou insuficientemente cozidos (THOMPSON, IIDA e SWINGS, 2004; SILVA et al. 2017).

No Brasil, estudos revelaram a ocorrência de *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio carchariae*, *Vibrio alginolyticus* e *Vibrio vulnificus* no ambiente aquático salino e também em alimentos de origem marinha. Estes patógenos permanecem viáveis e cultiváveis, na água, mesmo na ausência de matéria orgânica (PRUZZO, 2005).

As espécies de *Vibrio* isoladas de moluscos bivalves, correspondem a 75% das doenças transmitidas pelo consumo de alimentos de origem marinha. Gastroenterites e infecções de pele também estão associadas, e o número de casos aumentou nos últimos anos (TEPLITSKI, WRIGHT e LORCA, 2009).

A frequência de isolamento desses patógenos sugerem uma característica de sazonalidade, pois concentrações mais elevadas são detectadas nos meses de verão. Portanto, a presença de *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* em ostras está diretamente relacionada com

a temperatura da água. Acima de 20 °C observa-se as maiores concentrações e raramente são isolados quando a temperatura das águas se encontra abaixo de 15 °C (RODRIGUES et al. 2001; NASCIMENTO, VIEIRA e THEOPHILO, 2001; CABRERA, VASQUEZ e QUINONES, 2004; PEREIRA, VIANA e RODRIGUES, 2004; VIEIRA et al. 2004; PRUZZO, 2005; SU; LIU, 2007).

No estudo realizado por Ramos (2007), o qual avaliou a qualidade bacteriológica das águas de cultivo e as ostras (*Crassostrea gigas*), cultivadas na Baía Sul de Florianópolis - SC, constatou-se a presença de *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus*, especialmente nos meses de verão. Em outro estudo realizado por Ramos et al. (2014), também detectou-se a presença de *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* em amostras de águas de cultivo de ostras provenientes da Baía Sul de Florianópolis - SC, e as maiores densidades encontradas foram nos meses de verão, quando a temperatura da água apresentou média de 24 °C.

Prapaiwong, Wallace e Arias (2009) também observaram que o *Vibrio vulnificus* era mais facilmente isolado a partir de ostras cruas que cresciam em águas com temperaturas mais elevadas.

A possibilidade de consumidores de alimentos de origem marinha serem infectados por vibrios patogênicos através da ingestão de ostras, depende tanto da presença e quantidade deste patógeno no habitat marinho, quanto das práticas de manuseio e processamento dos moluscos (VIEIRA, 2011). Doenças associadas ao grupo dos vibrios tem aumentado nos últimos anos cerca de 40%, e entre as doenças transmitidas por produtos de origem marinha 75% estão relacionadas ao consumo de moluscos bivalves (TEPLITSKI, WRIGHT e LORCA, 2009).

2.4.4.1 *Vibrio parahaemolyticus*

Embora a maioria das doenças de origem alimentar possa ser adquirida a partir de diversos alimentos, a gastroenterite causada por *Vibrio parahaemolyticus* é contraída na maioria de suas vezes por frutos do mar. Quando outros alimentos estão envolvidos, eles foram transmitidos por contaminação cruzada com frutos do mar. Além de causar gastroenterite, o *Vibrio parahaemolyticus* é conhecido como causador de infecções fora do intestino humano (JAY, 2005).

O *Vibrio parahaemolyticus* é comum em águas oceânicas e costeiras, sua detecção está relacionada com a temperatura da água, não sendo detectável sua presença até que a temperatura da água alcance aproximadamente 19 a 20 °C. Esses micro-organismos vivem em

sedimentos durante o inverno e nos meses mais quentes são liberados na coluna de água, onde associam-se com o zooplâncton (JAY, 2005). A ocorrência deste patógeno nem sempre está associada à presença de organismos indicadores, mas às alterações físico-químicas do ambiente, como pH, salinidade e temperatura (DALSGAARD, 1998).

O *Vibrio parahaemolyticus* pode crescer na presença de 1 a 8% de NaCl, com um crescimento ótimo na faixa de 2 a 4%, sendo imprescindível para seu crescimento a presença de NaCl e não sobrevivendo em água destilada. A temperatura máxima de crescimento é 44 °C, com temperatura ótima entre 30 e 35 °C. Foi observado crescimento em uma faixa de pH entre 4,8 e 11, sendo a faixa ótima de 7,6 a 8,6. O pH mínimo de crescimento está relacionado com a temperatura e com o conteúdo de NaCl. Em condições ótimas, este organismo tem um tempo de geração de 9 a 13 minutos. A atividade de água ótima para o crescimento é em torno de 0,992 para o menor tempo de geração (JAY, 2005; FRANCO, 2008).

A aderência a células epiteliais é uma importante propriedade de virulência de bactérias Gram-negativas. Aparentemente, o *Vibrio parahaemolyticus* produz hemoaglutininas associadas as células que se correlacionam com a aderência na mucosa intestinal (JAY, 2005).

Em relação às suas características antigênicas, apresentam três tipos de antígenos: somático termoestável (O), capsular termolábil (K) e o antígeno flagelar (H). O antígeno K é um polissacarídeo ácido cuja estrutura apresenta diversos açúcares como pentoses, hexoses e hexosaminas. O antígeno O é um lipossacarídeo que contém açúcar, galactose, glucosamina, heptose, fósforo, éster de ácido graxo e compostos nitrogenados (FRANCO, 2008).

É um micro-organismo muito sensível a desidratação e ao calor. Estudos realizados demonstraram que em amostras de ostras, aquecidas a 60 e 80 °C, havia poucos sobreviventes após 15 minutos. Quando a temperatura foi elevada para 100 °C nenhuma cepa foi isolada (FRANCO, 2008).

Na maioria das vezes, provoca no ser humano gastroenterite branda, com duração de dois a três dias, apresentando sintomas como diarreia, câibras abdominais, náusea, vômito, dor de cabeça, febre baixa e calafrios, podendo ocorrer episódios mais severos. Os surtos registrados indicam que a causa é o consumo de alimentos de origem marinha, geralmente ostras, cruas ou inadequadamente cozidas, ou cozidas e recontaminadas (LEE et al. 2008; GARRIDO et al. 2012; SILVA et al. 2017).

As medidas de controle baseiam-se, no que diz respeito a produtos de origem marinha, no cozimento, na refrigeração e no congelamento adequado, de maneira a impedir

que as bactérias atinjam números elevados através da elevada multiplicação (FRANCO, 2008).

Os métodos de processamento têm sido o principal fator na redução das doenças relacionadas ao consumo de moluscos. As técnicas mais efetivas incluem o cozimento, a transposição, a depuração e alta pressão hidrostática. Esses métodos são praticados em diversos países europeus, assim como Estados Unidos, Austrália e Canadá (CORRÊA, 2006).

2.5 DETERIORAÇÃO DAS OSTRAS

Devido as características da maior parte dos alimentos, eles são facilmente atacados pelos micro-organismos. A alteração microbiológica é a alteração que mais danifica o alimento, transformando-o de tal modo em suas qualidades, que seu consumo se torna condenado (EVANGELISTA, 1994).

Os agentes da deterioração de moluscos, segundo as condições de temperatura, são bactérias psicrotróficas e mesófilas, em sua maioria com atividades proteolíticas. Alterações de cor, da tonalidade amarelo esverdeado são consequentes da presença de psicrofílos e *Pseudomonas* (EVANGELISTA, 1994). A atividade microbiana é principalmente responsável pelas mudanças no sabor, textura e odor das ostras (CAO et al. 2009; PRAPAIWONG, WALLACE e ARIAS, 2009; MONTANHINI; NETO, 2015).

Os moluscos apresentam algumas particularidades por conterem maior teor de glicídeos, em forma de glicogênio, do que os peixes; e apresentam ainda maior conteúdo de bases nitrogenadas do que os crustáceos. O comportamento microbiológico das ostras é avaliado através de seu pH, de suas modificações organolépticas e da contagem dos micro-organismos presentes (EVANGELISTA, 1994).

A análise de alimentos para a presença, os tipos e os números de micro-organismos e/ou seus produtos é muito importante na microbiologia de alimentos. A utilização de métodos para a detecção de micro-organismos é uma das ferramentas que garantem a segurança microbiológica dos alimentos. Métodos tradicionais utilizados em microbiologia são baseados nos aspectos morfológicos e bioquímicos para a identificação de gêneros, espécies e subespécies microbianas. Em função da multiplicidade de grupos, gêneros e espécies que podem estar presentes, os ensaios podem ser qualitativos, que verificam a presença ou ausência do(s) micro-organismo(s) alvo em uma dada quantidade de amostra, e/ou ensaios quantitativos, que determinam a quantidade do(s) micro-organismo(s) de

interesse na amostra, geralmente por unidade de massa ou volume (JAY, 2005; MAZIERO, 2007; GANDRA et al. 2008; LOURENÇO, 2011; SILVA et al. 2017).

2.5.1 Parâmetros que afetam o crescimento microbiano

A capacidade de sobrevivência ou de multiplicação dos micro-organismos que estão presentes em um alimento depende de uma série de fatores. Entre esses fatores, existem os que estão relacionados com as características próprias do alimento, fatores intrínsecos, e os relacionados com as propriedades do meio de armazenamento em que o alimento se encontra, fatores extrínsecos. São considerados fatores intrínsecos a atividade de água, pH, umidade, potencial de oxidação-redução, composição química, quantidade de nutrientes, constituintes antimicrobianos naturais e as interações entre os micro-organismos presentes no alimento. Entre os fatores extrínsecos, os de maior importância são a umidade relativa do meio, a temperatura de armazenamento e a presença e concentração de gases na atmosfera que envolve o alimento (EVANGELISTA, 1994; JAY, 2005).

2.5.2 pH

Os micro-organismos possuem um valor de pH mínimo, ótimo e máximo para sua multiplicação. Já está bem estabelecido que a maioria dos micro-organismos cresce melhor com valores de pH em torno de 7,0 (6,6 - 7,5), como *Escherichia coli* (6,0 - 8,0), *Pseudomonas* (6,6 - 7,0), *Salmonella* (6,0 - 7,5), *Staphylococcus aureus* (6,0 - 7,0), *Vibrio parahaemolyticus* (7,5 - 8,5), apesar de alguns poucos crescerem em pH abaixo de 4,0 (JAY, 2005; FRANCO, 2008).

Alimentos com pH maiores que 4,5 são os mais predispostos a multiplicação microbiana, tanto de espécies patogênicas quanto de espécies deteriorantes. A maioria dos frutos do mar possui pH em torno de 5,6. Isso faz com que as ostras sejam susceptíveis ao ataque desses micro-organismos por apresentar valores de pH entre 4,8 e 6,3 em condições normais (JAY, 2005; FRANCO, 2008).

O pH adverso afeta principalmente a respiração dos micro-organismos, por ação em suas enzimas e no transporte de nutrientes para dentro da célula microbiana. O pH desfavorável provoca um aumento na fase *lag* da multiplicação microbiana, porém seu efeito

inibidor depende do tipo de ácido presente no alimento, dos nutrientes, da atividade de água, temperatura e pressão de O₂ (MASSAGUER, 2005; FRANCO, 2008).

Apesar da grande variação de pH que pode ocorrer no meio extracelular, a membrana citoplasmática dos micro-organismos é relativamente impermeável aos íons H⁺ e OH⁻, dessa forma, sua concentração no citoplasma tende a permanecer constante (JAY, 2005).

O pH intracelular de quase todas as células está próximo da neutralidade, quando os micro-organismos estão em pH diferente do pH neutro, sua capacidade de multiplicação depende da capacidade de modificar o pH do meio para um valor ou faixa ótima (JAY, 2005; FRANCO, 2008).

Quando em pH ácido, as células precisam ou evitar que íons H⁺ entrem ou expeli-los numa velocidade maior que a de entrada, pois alguns compostos intracelulares essenciais, como o DNA e o ATP, necessitam da neutralidade. Quando a maioria dos micro-organismos crescem em ambiente ácido, sua atividade metabólica faz com que o meio ou o substrato se torne menos ácido, como consequência das aminoácido-descarboxilases que foram ativadas, resultando na produção de aminas, que aumentam o pH (JAY, 2005).

Por outro lado, em pH alcalino, ocorre a ativação de aminoácido-desaminases, que produzem ácidos orgânicos, cujo efeito é a redução do pH.

Em relação ao transporte de nutrientes, a célula bacteriana tende a possuir uma carga negativa, por consequência, compostos não-ionizados entram na célula, enquanto compostos ionizados são barrados. Ou seja, em pH neutro ou alcalino, os ácidos orgânicos não entram na célula, já em valores de pH ácido, esses compostos estão não-ionizados e conseguem permear através da membrana citoplasmática da bactéria (JAY, 2005; FRANCO, 2008).

Outras implicações que o pH adverso provoca nos micro-organismos, são as interações entre os íons H⁺ e as enzimas da membrana citoplasmática. O caráter iônico da cadeia lateral de grupos ionizáveis é afetado, resultando numa desnaturação crescente da membrana e das enzimas de transporte. A morfologia de alguns micro-organismos também pode ser alterada pelo pH (JAY, 2005).

Outros fatores do ambiente interagem com o pH. Em relação à temperatura, o pH do meio se torna mais ácido à medida que a temperatura aumenta. A concentração salina possui um efeito definido sobre o pH, quando a quantidade de sal aumenta, excedendo um nível ótimo, a faixa de pH de crescimento fica mais estreita (JAY, 2005).

O crescimento de micro-organismos fora de sua faixa de pH de crescimento resulta em uma fase *lag*, de adaptação, maior. Em outras palavras, a duração da fase *lag* reflete o

tempo necessário para que os micro-organismos tragam o pH do meio externo para sua faixa ótima de pH de crescimento (JAY, 2005).

2.5.3 Temperatura de armazenamento

O parâmetro temperatura é um dos fatores extrínsecos que mais afeta a atividade bioquímica dos micro-organismos e que mais afeta a multiplicação desses. Quanto menor for a temperatura, menor será a atividade microbiana. Os micro-organismos podem se multiplicar em uma faixa bastante ampla de temperatura e são classificados de acordo com a temperatura ideal de multiplicação (JAY, 2005; FRANCO, 2008).

Os micro-organismos psicrófilos, têm a temperatura de multiplicação entre 0 °C e 20 °C, com um ótimo entre 10 e 15 °C. Os psicrotróficos, têm a capacidade de se desenvolver entre 0 °C e 7 °C, com produção de colônias ou turvação do meio de cultura em 7 a 10 dias. Na classificação tradicional dos micro-organismos em função da temperatura (termófilos, mesófilos e psicrófilos), os psicrotróficos são um subgrupo dos mesófilos. Por que os psicrófilos, geralmente, morrem à temperatura ambiente. Os psicrotróficos, ao contrário, se multiplicam em alimentos refrigerados, mas crescem melhor nas temperaturas da faixa mesófila. A refrigeração de alimentos permite o armazenamento em temperaturas inferiores às do ambiente, normalmente de 0 °C a 10 °C. Esses micro-organismos multiplicam-se em alimentos refrigerados, mantidos abaixo de 7 °C, sendo os principais agentes de deterioração dos frutos do mar (MASSAGUER, 2005; FRANCO, 2008; SILVA et al. 2017).

Os psicrotróficos mais encontrados em alimentos são aqueles que pertencem ao gênero *Pseudomonas*, causando deterioração em alimentos normalmente armazenados nessas temperaturas, como carnes e frutos do mar. A microbiota dominante das ostras pertence a bactérias Gram-negativas especificamente do gênero *Pseudomonas* e da família *Vibrionaceae* (GRAM e HUSS, 1996; HUSS, 1997; JAY, 2005; CAO, XUE e LIU, 2009; SILVA et al. 2017).

O gênero *Pseudomonas* pertence à família das *Pseudomonaceae*, são bastonetes Gram-negativos, retos ou curvos, móveis em sua maioria, apresentando um ou mais flagelos polares, algumas espécies podem também formar flagelos laterais, são aeróbias estritas, não esporuladas, catalase e oxidase positivas. Algumas espécies, entretanto, podem usar o nitrato como aceptor de elétrons, permitindo seu crescimento em condições anaeróbias (reduzem nitrato a nitrito ou nitrogênio, fenômeno chamado de denitrificação). As *Pseudomonas* não

necessitam de fatores nutricionais específicos para crescimento, contudo não toleram condições ácidas e nenhuma espécie cresce em pH menor que 4,5. Várias espécies formam pigmentos fluorescentes (fenazinas verdes, azuis ou laranja e pioverdinaz verde amareladas), não fluorescentes (verdes, laranja, amarelos ou azuis) ou ambos. Constituindo o maior gênero de bactérias encontradas em alimentos frescos. São tipicamente bactérias de solo e de água e estão amplamente distribuídas entre os alimentos, especialmente vegetais, carnes vermelhas, carnes de frango e frutos do mar. Constituem, de longe, o mais importante grupo de bactérias responsáveis pela deterioração de alimentos frescos refrigerados, pois a temperatura ótima da maioria das espécies é em torno de 28 °C, algumas espécies crescem a 45 °C e várias crescem bem a 4 °C, ou seja, psicotróficas (JAY, 2005; MASSAGUER, 2005; SILVA et al. 2017).

As *Pseudomonas* são relevantes em alimentos devido sua intensa atividade metabólica, sendo capazes de utilizar uma grande variedade de compostos orgânicos, além de produzirem pigmentos hidrossolúveis, enzimas proteolíticas e lipolíticas. *Pseudomonas* psicotróficas são encontradas em alimentos refrigerados e congelados (FRANCO, 2008).

Alguns estudos consideram as *Pseudomonas* como as bactérias mais importantes na deterioração das ostras e constataram que a *Pseudomonas* faz parte dos micro-organismos específicos da degradação, proliferando-se expressivamente ao longo do armazenamento sob refrigeração. A legislação brasileira não estabelece padrões para esses micro-organismos, cuja presença é importante do ponto de vista do controle de deteriorantes (JAY, 2005; SILVA et al. 2017).

Em estudo realizado por Cao et al. (2009), com ostras armazenadas a 0 °C, 5 °C e 10 °C, *Pseudomonas* foi a principal espécie detectada (42 - 66%), e a família *Vibrionaceae* em segundo com 20%. Após o armazenamento a 4 °C durante 7 dias, as bactérias de deterioração foram *Vibrio*, *Arcobacter* e *Pseudoalteromonas* em ostras do Pacífico (MADIGAN et al. 2014). A microbiota bacteriana de deterioração da ostra (*Crassostrea gigas*) após o armazenamento de 4 °C foi *Psychrilyobacter* spp., *Fusobacteria*, *Spirochaetes* (FERNANDEZ-PIQUER et al. 2012).

2.5.4 Alterações causadas por micro-organismos em ostras

O desenvolvimento de micro-organismos nos alimentos pode levar a alterações em sua composição química, em suas propriedades organolépticas e em sua estrutura, recebendo o nome de deterioração. A ostra é um dos alimentos mais suscetíveis a deterioração, por ser

uma excelente fonte de proteína, possuir uma atividade de água elevada e pH próximo a neutralidade (FRANCO, 2008).

Esses animais diferem na sua composição química tanto dos peixes como dos crustáceos, por possuírem um nível significativo de carboidratos e uma pequena quantidade total de nitrogênio em sua carne. Os peixes teleósteos não possuem carboidratos, os crustáceos em torno de 0,5%, os mexilhões e vieiras 3,4% e as ostras apresentam cerca de 5,6% de carboidratos (JAY, 2005).

O carboidrato está basicamente na forma de glicogênio, deste modo, as atividades fermentativas ocorrem como parte da deterioração microbiana. A carne dos moluscos contém elevados níveis de bases nitrogenadas, possuindo graus mais altos de arginina, ácidos aspártico e glutâmico do que a carne de peixes (JAY, 2005).

Pesquisadores propuseram a determinação da qualidade microbiana de ostras, baseada em valores de pH, devido ao nível existente de carboidratos, principalmente glicogênio. Valores de pH entre 6,2 e 5,9 são considerados bom para ostras; 5,8 não muito bom (início de deterioração); entre 5,7 e 5,5 considera-se mofado e valores de pH menores que 5,2 azedo ou pútrido (JAY, 2005).

A medição do decréscimo do pH é um dos testes de deterioração de ostras, todavia, avaliações organolépticas e contagens de micro-organismos são indicadores imprescindíveis da qualidade microbiana desse produto.

2.6 ACONDICIONAMENTO SOB ATMOSFERA MODIFICADA

O acondicionamento sob atmosfera modificada é utilizado para modificar a atmosfera ao redor do alimento com o objetivo de prolongar a vida útil do produto. De um modo geral, os métodos com atmosfera modificada consistem nas diferentes maneiras pelas quais o dióxido de carbono (CO_2) é utilizado como conservante de alimentos (JAY, 2005).

Em 1990, Stammen, Gerdes e Caporaso definiram o acondicionamento em atmosfera modificada como um sistema onde o ar de dentro de uma embalagem é substituído por uma mistura de gases, onde a proporção dessa mistura gasosa é estabelecida no momento do enchimento da embalagem e antes da selagem final (MCMILLIN, 2008)

A atmosfera modificada é um método não térmico de preservação de alimentos que utiliza, principalmente, os gases dióxido de carbono (CO_2), o oxigênio (O_2) e nitrogênio (N_2)

para compor a atmosfera no interior da embalagem, sendo esta diferentemente da composição do ar atmosférico (PHILLIPS, 1996; MEREDITH et al. 2014).

Em 1889, foi reconhecida a atividade antibacteriana do CO₂ e em 1910 institui-se a sua utilização em embalagens para modificar a atmosfera interna promovendo a conservação de diversos alimentos (JAY, 2005).

O dióxido de carbono é o gás mais importante, devido sua ação bacteriostática comprovada sobre os micro-organismos que causam a deterioração de alimentos (SIVERTSVIK, JEKSRUD e ROSNES, 2002). Segundo o FDA (Food and Drug Administration, 2017), o CO₂ é um antimicrobiano natural, atóxico e reconhecido como substância GRAS (*Generally Recognized as Safe*). Para inibir o crescimento microbiológico é necessária que uma determinada quantidade de CO₂ se dissolva no alimento, o que dependerá de diversos fatores e essa inibição será proporcional à concentração de CO₂ dissolvido no produto (DEVLIEGHERE et al. 1998a, 1998b).

Entretanto o CO₂ não retarda o crescimento de todos os micro-organismos, e seu efeito inibidor aumenta com a diminuição da temperatura, em decorrência do aumento da sua solubilidade (STAMMEN, GERDES e CAPORASO, 1990; PARRY, 1993; SIVERTSVIK, JEKSRUD e ROSNES, 2002).

Ao dissolver-se em água, o CO₂ dá origem ao ácido carbônico, provocando um efeito acidificante. A solubilidade do CO₂ interfere, também, na capacidade de retenção de água do alimento, onde maiores concentrações provocam uma maior liberação de exsudados (SIVERTSVIK, ROSNES e BERGSLIEN, 2002).

Existem algumas ocorrências conhecidas sobre a exposição prolongada dos micro-organismos à concentrações de 10% ou mais de CO₂ (JAY, 2005).

- A atividade inibitória aumenta se a temperatura de armazenamento diminui. Isso se deve à maior solubilidade do CO₂ em água sob temperaturas menores e, em parte, ao efeito adicional de uma temperatura de crescimento sub ótima.
- Em geral, as bactérias Gram-negativas são mais sensíveis à inibição pelo CO₂ do que as Gram-positivas, sendo as *Pseudomonas* classificadas como uma das mais afetadas.
- Tanto a fase *lag* quanto a fase logarítmica do crescimento microbiano são retardadas.

Existem algumas explicações para o mecanismo de inibição do CO₂ sobre os micro-organismos, são elas: alterações na função da membrana celular, interferindo no transporte de íons; disfunções na absorção de nutrientes; inibição e/ou diminuição de reações enzimáticas; alterações do pH intracelular e modificações diretas nas propriedades físico-químicas das proteínas no interior dos micro-organismos. O efeito bacteriostático do dióxido de carbono é

uma ação combinada de todos estes mecanismos e ocorre com diferentes intensidades em todas as espécies bacterianas (WOLFE, 1980; SIVERTSVIK, JEKSRUD e ROSNES, 2002; YUAN, 2003; JAY, 2005; BRANDENBURG; ZAGORY, 2009).

Como o CO₂ presente na atmosfera da embalagem se dissolve na fase aquosa dos alimentos, formando ácido carbônico, o HCO₃⁻ estará presente como um produto de dissociação, causando mudanças na permeabilidade celular. A permeabilidade da membrana celular é afetada pelo acúmulo de CO₂ na bicamada lipídica, resultando em um aumento da fluidez da mesma (JAY, 2005).

O efeito na inibição do crescimento bacteriano pelo CO₂, também está relacionado com seu maior poder de penetração nas células dos micro-organismos. Por apresentar comportamento apolar quando na forma gasosa, sua penetração é facilitada através da dupla camada de fosfolipídios que compõe a membrana celular (HAAS et al. 1989; WEI et al. 1991; LIN, YANG e CHEN, 1993).

O CO₂ quando dissolvido em água, forma outros produtos como o diacetil, que através de mecanismos diferentes do CO₂ também possui aspectos antimicrobianos. O diacetil é antagonista da arginina, e seu mecanismo de atuação é devido à grande sensibilidade das bactérias Gram-negativas aos inibidores do tipo α -dicarbonil. Esses causam a inativação de proteínas ligantes de aminoácidos do periplasma celular, especialmente, proteínas ligantes de arginina interferindo no funcionamento normal dessas proteínas (JAY, 2005).

A capacidade de absorção de CO₂ pelo alimento depende da relação entre volume de gás e volume de produto (g/p), pressão parcial de CO₂ a que o alimento é submetido, temperatura, características biológicas do alimento, como por exemplo, o pH e a relação entre os conteúdos água e gordura. Dependendo destes fatores, a quantidade de CO₂ absorvido varia entre 0 a 1,79 litros de CO₂ por quilograma de alimento (JAKOBSEN; BERTELSEN, 2006).

O dióxido de carbono é mais solúvel em água do que o O₂, deste modo desloca o oxigênio dissolvido no alimento, reduzindo parcial ou totalmente o oxigênio disponível para o metabolismo de micro-organismos aeróbios (DANIELS, KRISHNAMURTHI e RIZVI, 1985; LOSS; HOTCHKISS, 2003).

O oxigênio (O₂) também é usado em embalagens com atmosfera modificada devido a sua capacidade de promover a cor vermelha em carnes frescas e conservá-la durante o armazenamento, por manter a respiração de frutas e vegetais e também para reduzir a perda de líquidos (exsudado) em peixes magros (JAYASINGH et al. 2002; SEYFERT et al. 2004; MANCINI; HUNT, 2005; MCMILLIN, 2008; BRANDENBURG; ZAGORY, 2009). No

entanto, altas concentrações de oxigênio possuem limitações devido à sua atividade oxidante (GROBBEL et al. 2008; ZAKRYS et al. 2008).

O nitrogênio (N_2) é um gás inerte e insípido, que apresenta baixa solubilidade em água e lipídios, não sendo absorvido pelo alimento, o que o torna um gás de preenchimento, evitando o colapso da embalagem pela absorção e dissolução do CO_2 na matriz alimentícia. O nitrogênio também é utilizado como substituição do oxigênio na embalagem, inibindo o crescimento microbiano e em produtos sensíveis à oxidação, como alternativa à embalagem a vácuo (CHURCH, 1994; PHILLIPS, 1996; SIVERTSVIK, JEKSRUD; ROSNES 2002; SIVERTSVIK, ROSNES e BERGSLIEN, 2002; SOCCOL; OETTERER, 2003; KERRY, O'GRADY e HOGAN, 2006; PATSIAS et al. 2006; SCHIRMER; LANGSRUD, 2010).

A eficiência da atmosfera modificada pode ser aumentada em produtos que não respiram, como é o caso dos frutos do mar. Utilizando uma relação gás/produto (g/p) adequada, visando garantir a disponibilidade do CO_2 como agente bacteriostático e evitando o colapso da embalagem. Para frutos do mar, recomenda-se uma relação g/p de 2:1 a 3:1 (volume do gás duas a três vezes superior ao volume do alimento). Este g/p, bastante elevado, é também necessário para impedir o colapso da embalagem, devido à solubilidade do CO_2 em alimentos com grande quantidade de água, uma vez que o CO_2 dissolvido ocupa menos volume comparado com o CO_2 gasoso (SIVERTSVIK, JEKSRUD e ROSNES, 2002; SIVERTSVIK; BIRKELAND, 2006).

A eficácia da embalagem em atmosfera modificada depende de vários fatores, sobretudo, do tipo de alimento, da qualidade inicial da matéria-prima, da mistura de gases utilizada, da temperatura de armazenamento, das condições de higiene durante o processamento e das propriedades de barreira do material utilizado na composição da embalagem (SIVERTSVIK, JEKSRUD e ROSNES, 2002; GOULAS; KONTOMINAS, 2007).

O sucesso da atmosfera modificada está relacionado com a qualidade dos filmes utilizados no envase do produto, os quais devem ter a capacidade de manter a atmosfera criada, durante o maior período de tempo possível. Além de possuírem resistência à abrasão, ruptura e perfuração; espessura adequada a fim de evitar microporos; permeabilidade aos gases e ao vapor de água, e a capacidade de manter a integridade da selagem da embalagem, são essenciais para prolongar a vida útil do produto. Os polímeros mais utilizados são o polietileno, a poliamida, o polipropileno, o poliestireno, o cloreto de polivinil (PVC), o cloreto de polivinileno, o poliéster, o etilvinilálcool. A maioria dos filmes aplicados são constituídos por várias camadas e das combinações entre estes, com o intuito de melhorar a

eficiência da embalagem (STAMMEN, GERDES e CAPORASO, 1990; PAUL; CLARKE, 2002; MANGARAJ, GOSWAMI e MAHAJAN, 2009).

A deterioração microbiana é um dos principais contribuintes para a perda de qualidade e deterioração dos produtos marinhos. A embalagem em atmosfera modificada aliada ao armazenamento à baixas temperaturas é uma técnica eficaz para alcançar a extensão da vida útil desses produtos, como as ostras (SIVERTSVIK, JEKSRUD e ROSNES, 2002; WANG et al. 2008; POWELL, RATKOWSKY e TAMPLIN, 2015)

Vale ressaltar que a embalagem em atmosfera modificada não melhora a qualidade inicial do produto, mantendo, em condições ideais, a qualidade existente no momento da selagem da embalagem. Isso faz com que as condições de colheita, manuseio e processamento sejam determinantes para a qualidade do produto final (BRANDENBURG; ZAGORY, 2009).

3 MATERIAS E MÉTODOS

3.1 Preparo das Amostras

As ostras (*Crassostrea gigas*) com tamanho médio, medindo cerca de 8 cm, foram adquiridas de um produtor local do bairro de Sambaqui, Florianópolis - SC. As sementes das ostras, foram obtidas em parceria com o Laboratório de Moluscos Marinhos da Universidade Federal de Santa Catarina (LMM - UFSC).

Na própria localidade, após serem retiradas do mar, as ostras receberam jatos de água potável, para uma pré-remoção das sujidades aderidas em suas conchas e seguiram para transporte em caixas de isopor ao Laboratório de Propriedades Físicas de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina (PROFI - UFSC). No momento em que chegaram ao Laboratório PROFI, as mesmas foram novamente lavadas em água corrente para a remoção de qualquer sujeira restante.

Em bateladas de 6 dúzias de ostras, aplicou-se o tratamento térmico a vapor por 15 minutos a 100 °C. Em seguida, as ostras foram retiradas de suas conchas com faca estéril e depositadas em um Becker também estéril para serem resfriadas até aproximadamente 4 °C.

3.2 Acondicionamento em Atmosfera Modificada

Cerca de 100 g de ostras inteiras foram acondicionadas em embalagens de alta barreira, constituída por poliamidas, polietileno e polietileno modificado, com espessura de 90 µm, da empresa Spel Embalagens Ltda.

A injeção de CO₂ puro ou mistura de gases foi realizada utilizando uma seladora bi-ativa (Selovac, Brasil), com envase programado de 09 segundos de vácuo, seguidos de 10 segundos de enchimento do gás (2 bar) de interesse para compor as atmosferas: Ar atmosférico, 80% N₂ - 20% CO₂ (White Martins) e 100% CO₂ (Linde). Após a expulsão do gás as embalagens foram automaticamente seladas.

As amostras foram imediatamente resfriadas a 4 °C e, em seguida, transportadas em caixas térmicas ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos II da Universidade Federal de Santa Catarina, as quais permaneceram armazenadas em BOD durante 28 dias a 4 °C.

3.3 Análises Microbiológicas

As análises microbiológicas foram realizadas em triplicata nos dias 0, 3, 7, 10, 14, 17, 21, 24 e 28 de armazenamento para os tratamentos 80% N₂ – 20% CO₂ e 100% CO₂. Para as amostras embaladas em ar atmosférico (controle), as análises foram realizadas em triplicata nos dias 0, 10 e 17. Amostras de ostras *in natura* também foram analisadas para elucidação da carga microbiana inicial.

A metodologia utilizada para a contagem total de micro-organismos mesófilos e psicrotróficos foi de acordo com o *American Public Health Association* (APHA), descritas na 5ª edição do *Compendium of Methods of the Microbiological Examination of Foods* (2015). A confirmação preliminar de *Vibrio* ssp. seguiu a metodologia do *Food and Drug Administration* (FDA), descrito no capítulo 9 do *Bacteriological Analytical Manual* (BAM, 2004) e da *American Public Health Association* (APHA), descritas na 4ª edição do *Compendium of Methods for Microbiological Examination of Foods* (2001). Os limites de detecção para os ensaios de micro-organismos mesófilos totais é de 10 UFC.g⁻¹ e para bactérias psicrotróficas 100 UFC.g⁻¹.

Todas as atividades foram conduzidas sob condições assépticas, e próximas ao bico de Bunsen. Antes do início das atividades, a área de trabalho foi limpa e desinfetada com etanol 70%, as janelas e portas do laboratório foram mantidas fechadas, para evitar a corrente de ar. Antes de abrir as embalagens, as mesmas foram desinfetadas na parte externa com etanol 70%. Os utensílios utilizados para a abertura das embalagens e retirada das unidades analíticas foram previamente mergulhados em etanol 70% e flambados no momento do uso.

3.3.1 Contagem total de micro-organismos mesófilos

Primeiramente, homogeneizou-se o conteúdo da embalagem, logo após, foi retirada a unidade analítica de 25 gramas composta por diferentes regiões do corpo da ostra em sacos de homogeneização estéreis. Adicionou-se 225 mL de Água Peptonada 0,1% (diluyente), seguido de agitação em Stomacher (Intersciense) por 60 segundos, dando origem a primeira diluição da amostra 1:10 (10⁻¹).

Para obter a segunda diluição (10⁻²), transferiu-se assepticamente com o auxílio de uma micropipeta 1 mL da primeira diluição (10⁻¹) para 9 mL de Água Peptonada 0,1% e o

conteúdo foi homogeneizado com um agitador do tipo Vortex (Phoenix Luferco) por 15 segundos.

As diluições subseqüentes, foram obtidas de maneira similar, transferindo 1 mL da diluição anterior para 9 mL do diluente, seguido de agitação.

Com a diluição seriada pronta, iniciou-se o processo de plaqueamento, o qual consistiu em inocular 1 mL de cada diluição em duas placas de Petri separadas (duplicata), estéreis e vazias, abrindo as placas apenas o suficiente para inserir a pipeta. As diluições selecionadas para o plaqueamento foram escolhidas de forma a obter placas entre 25 a 250 colônias.

Seguidamente, retirou-se o meio de cultura Ágar Padrão de Contagem (Plate Count Agar - Merck) do banho a 44 – 46 °C e verteu-se 12 a 15 mL nas placas contendo o inóculo. Homogeneizou-se em movimentos na forma de oito, oito vezes no sentido horário e oito vezes no sentido anti-horário. Após, a completa solidificação do meio de cultura, inverteu-se as placas, as quais foram incubadas a 35 ± 1 °C por 48 horas.

Completado o tempo de incubação, selecionou-se as placas que apresentavam entre 25 e 250 colônias e contou-se as unidades formadoras de colônias com a ajuda de um contador de colônias (Phoenix Luferco).

3.3.2 Contagem total de micro-organismos psicrotróficos

Os procedimentos que antecedem a etapa de inoculação foram os mesmos realizados para a contagem total de mesófilos, diferenciando-se somente a forma de plaqueamento, onde para mesófilos foi realizado plaqueamento em profundidade e para psicrotróficos plaqueamento em superfície.

Após a diluição seriada concluída, iniciou-se o processo de plaqueamento, que consistiu em inocular 0,1 mL de cada diluição em duas placas de Petri separadas (duplicata), estéreis e contendo o Ágar Padrão de Contagem (Plate Count Agar - Merck) já solidificado, o qual foi previamente preparado. As placas foram abertas somente o suficiente para inserir a pipeta e em seguida espalhar o inóculo por toda a superfície do meio, com uma alça de Drigalski, até que o excesso de líquido fosse totalmente absorvido. As placas foram incubadas invertidas a $7^\circ \pm 1^\circ\text{C}$ por 10 dias.

As diluições selecionadas para o plaqueamento foram escolhidas, de forma a obter placas entre 10 e 300 colônias. Para a contagem das placas selecionou-se as placas com

colônias entre este intervalo e contou-se com a ajuda de um contador de colônias (Phoenix Luferco).

3.3.3 Análise presuntiva de *Vibrio* ssp.

De maneira similar aos procedimentos descritos nos itens 3.3.1 e 3.3.2, primeiramente, homogeneizou-se o conteúdo da embalagem, em seguida, foi retirada a unidade analítica de 25 gramas composta por diferentes regiões do corpo da ostra em sacos de homogeneização estéreis. Adicionou-se 225 mL de Água Peptonada Salina (3% NaCl), homogeneizou-se em Stomacher (Intersciense) por 60 segundos, dando origem a primeira diluição da amostra 1:10 (10^{-1}).

Para obter a segunda diluição (10^{-2}), transferiu-se assepticamente com o auxílio de uma micropipeta 1 mL da primeira diluição (10^{-1}) para 9 mL de Água Peptonada Salina (3% NaCl) e homogeneizou-se o conteúdo com um agitador do tipo Vortex (Phoenix Luferco) por 15 segundos. Para obter a terceira diluição (10^{-3}), transferiu-se assepticamente com o auxílio de uma micropipeta 1 mL da segunda diluição (10^{-2}) para 9 mL de Água Peptonada Salina (3% NaCl) e homogeneizou-se o conteúdo por 15 segundos.

Concluídas as diluições 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} , iniciou-se o procedimento denominado de enriquecimento, onde foi transferido assepticamente com o auxílio de uma micropipeta 1 mL de cada diluição para três tubos contendo 10 mL de Água Peptonada Alcalina (APA), homogeneizou-se o conteúdo com um agitador do tipo Vortex (Phoenix Luferco) por 15 segundos e os tubos foram incubados a 35 ± 1 °C por 18 - 24 horas.

Após completado o tempo de incubação, selecionou-se os tubos turvos, os quais indicam crescimento microbiano e com alças de 1 µL estriou-se em duplicata no meio TCBS (Ágar Tiosulfato Citrato Bile Sacarose – Acumedia), previamente preparado e solidificado. As placas foram incubadas invertidas a 35 ± 1 °C por 18 - 24 horas.

Ao completar 18 horas de incubação foi realizada a leitura das placas, onde colônias amarelas são indicativas de *Vibrio cholerae* e colônias verdes são indicativas de *Vibrio parahaemolyticus*. A análise realizada foi presuntiva para *Vibrio* ssp., pois não efetuou-se confirmações bioquímicas das colônias suspeitas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação microbiológica das ostras acondicionadas em 100% de CO₂

A Tabela 1 mostra o resultado em logaritmo das Unidades Formadoras de Colônias por grama de amostra de ostra (Log UFC.g⁻¹), embaladas em 100% CO₂ durante 28 dias de armazenamento a 4 °C, para o grupo de bactérias mesófilas e psicrotróficas. Comparando os valores da amostra *in natura* e no dia 0 (zero) de armazenamento observou-se que o tratamento térmico aplicado foi capaz de inativar um log na carga microbiana de microorganismos mesófilos reduzindo de 3,24 para 2,75 Log UFC.g⁻¹ e nos psicrotróficos de 3,52 para < 2,00 Log UFC.g⁻¹.

Durante 17 dias de armazenamento a contagem de mesófilos manteve-se constante, onde confirma a capacidade bacteriostática do CO₂ quando em concentrações elevadas. Efeito também observado quando analisada as contagens de bactérias psicrotróficas, grupo evidenciado na literatura como mais sensíveis ao dióxido de carbono, onde durante os 28 dias de armazenamento não houve crescimento de colônias, portanto o resultado obtido é menor do que o limite de detecção da metodologia utilizada.

Tabela 1 – Contagem microbiológica de bactérias mesófilas e psicrotróficas totais para ostras acondicionadas em atmosfera modificada composta por 100% CO₂.

| | Mesófilos Totais | Psicrotróficos Totais |
|-------------------------|-------------------------|--------------------------|
| Armazenamento (dias) | Log UFC.g ⁻¹ | Log UFC.g ⁻¹ |
| <i>in natura</i> | 3,24 | 3,52 |
| 0 | 2,75 | < 2,00 |
| 3 | 2,62 | < 2,00 |
| 7 | 2,66 | < 2,00 |
| 10 | 2,43 | < 2,00 |
| 14 | 2,78 | < 2,00 |
| 17 | 2,77 | < 2,00 |
| 21 | 3,00 | < 2,00 |
| 24 | 2,34 | < 2,00 |
| 28 | 3,06 | < 2,00 |

Fonte: Produção do próprio autor.

Durante os 28 dias de armazenamento as ostras embaladas em 100% de CO₂ apresentaram aspectos visualmente agradáveis de odor, cor e textura. O odor característico de

ostras frescas foi presenciado junto a uma leve percepção de acidez, no momento da abertura das embalagens.

Milne e Powell (2014), estudaram a dinâmica do crescimento microbiano em salmão do Atlântico fresco (*Salmo salar*) embalado em atmosfera modificada de 96% de CO₂ armazenadas por 38 dias sob baixas temperaturas. Avaliaram os grupos psicotróficos e mesófilos por metodologias clássicas, aliadas à técnicas moleculares de DNA. Observaram a fase *lag* prolongada em 10 dias para psicotróficos e em 15 dias para os mesófilos, atingindo 10⁶ UFC.g⁻¹ após 21 dias (psicotróficos) e 25 dias (mesófilos). Aos 31 dias, ambas as contagens encontravam-se em 10⁸ UFC.g⁻¹ e a microbiota dominante era composta por *Pseudomonas* spp..

4.2 Avaliação microbiológica das ostras acondicionadas em 80% de N₂ - 20% de CO₂

A Tabela 2, mostra o resultado em logaritmo das Unidades Formadoras de Colônias por grama de amostra de ostra (Log UFC.g⁻¹), embaladas em 80% N₂ – 20% CO₂ durante 28 dias de armazenamento a 4 °C, para o grupo de bactérias mesófilas e psicotróficas. Nota-se que o tratamento térmico aplicado também foi capaz de reduzir um log na contagem microbiana de mesófilos, de 3,24 Log UFC.g⁻¹ das amostras *in natura* para 2,30 Log UFC.g⁻¹ no dia 0 (zero) de estocagem. O efeito bacteriostático do CO₂ foi capaz de retardar o crescimento de mesófilos somente até o décimo quarto dia, onde ocorre novamente a elevação de um log nas contagens (3,58 Log UFC.g⁻¹). Sobre o grupo de micro-organismos psicotróficos, as contagens mantiveram-se baixas até o décimo dia, a partir do qual houve um elevado crescimento. Ambas as contagens demonstram que baixas concentrações de CO₂ são menos eficazes no prolongamento da fase *lag* do crescimento microbiano.

Além das contagens microbiológicas mais elevadas a partir do décimo dia, limitando a vida de prateleira da embalagem composta por 80% N₂ - 20% CO₂, as ostras apresentaram odor e cor desagradáveis e um aspecto mais mole na textura das mesmas. Para uma avaliação mais completa dos aspectos sensoriais também faz-se necessário análises específicas de cor, textura e bases voláteis juntamente com avaliações sensoriais realizada por uma equipe de julgadores treinados.

Tabela 2 – Contagem microbiológica de bactérias mesófilas e psicrotróficas totais para ostras acondicionadas em atmosfera modificada composta por 80% N₂ – 20% CO₂.

| | Mesófilos Totais | Psicrotróficos Totais |
|-------------------------|-------------------------|--------------------------|
| Armazenamento (dias) | Log UFC.g ⁻¹ | Log UFC.g ⁻¹ |
| <i>in natura</i> | 3,24 | 3,35 |
| 0 | 2,30 | < 2,00 |
| 3 | 2,82 | 2,16 |
| 7 | 2,65 | < 2,00 |
| 10 | 2,81 | 2,26 |
| 14 | 3,58 | 3,75 |
| 17 | 3,65 | 4,77 |
| 21 | 4,00 | 3,56 |
| 24 | 4,80 | 4,42 |
| 28 | 4,25 | 6,06 |

Fonte: Produção do próprio autor.

Rodrigues et al. (2016), avaliaram filés de truta (*Oncorhynchus mykiss*) submetidas a cinco diferentes tratamentos que consistiam na ação combinada ou não, de radiação ultravioleta (UV) e embalagem em atmosfera modificada, armazenadas a 4 °C. Em geral, a radiação UV-C promoveu a extensão da fase *lag* nos grupos mesófilos e psicrotróficos. A embalagem em atmosfera modificada reduziu significativamente a contagem de mesófilos totais. A atmosfera modificada combinada com UV-C reduziram as contagens de mesófilos e psicrotróficos totais. Os valores de pH diminuíram durante o armazenamento, exceto nas embalagens aeróbicas. A menor produção de compostos característicos de degradação foi presenciada nas embalagem com atmosfera modificada. As mesmas obtiveram menores valores na produção total de amônia, TVB-N (Nitrogênios das Bases Voláteis Total) e putrescina.

4.3 Avaliação microbiológica das ostras acondicionadas em ar atmosférico

A Tabela 3, mostra os resultados para a amostra embalada em ar atmosférico (controle). Nota-se que a composição de 80% N₂ - 20% de CO₂ não foi tão eficaz quanto a 100% CO₂, porém quando comparada com a amostra controle, a contagem microbiológica é consideravelmente mais elevada, principalmente, no décimo sétimo dia de armazenamento, onde o desenvolvimento bacteriano atinge 6,15 Log UFC.g⁻¹ para mesófilos e 5,74 Log UFC.g⁻¹ para psicrotróficos, não sendo recomendável o consumo.

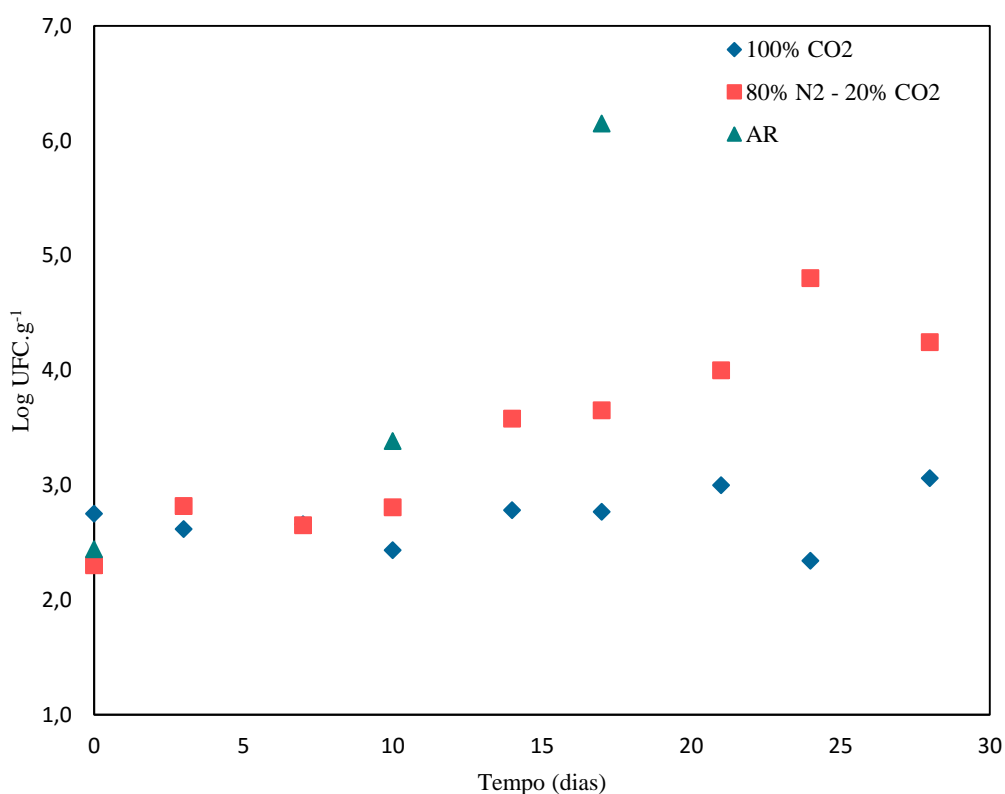
No décimo dia odores desagradáveis foram percebidos, assim como o amolecimento do tecido corporal das ostras, decorrentes da deterioração microbiana.

Tabela 3 – Contagem microbiológica de bactérias mesófilas e psicrotróficas totais na embalagem composta por ar atmosférico.

| | Mesófilos Totais | Psicrotróficos Totais |
|-------------------------|-------------------------|--------------------------|
| Armazenamento (dias) | Log UFC.g ⁻¹ | Log UFC.g ⁻¹ |
| <i>in natura</i> | 2,98 | 2,91 |
| 0 | 2,44 | < 2,00 |
| 10 | 3,38 | 3,43 |
| 17 | 6,15 | 5,74 |

Fonte: Produção do próprio autor.

Figura 1 – Evolução do crescimento de bactérias mesófilas nas amostras de ostras acondicionadas em ar atmosférico, 80% N₂ – 20% CO₂ e 100% CO₂.



Fonte: Produção do próprio autor.

Por meio da Figura 1, é possível perceber a tendência do crescimento microbiano durante o armazenamento. No tempo 0 (zero) a contagem de mesófilos para os três tratamentos

aplicados foi menor que 3 logs. As amostras embaladas em ar atmosférico (controle) apresentam uma tendência crescente ao crescimento microbiológico conforme os dias de armazenamento, seguida do acondicionamento das ostras em atmosfera de 80% N₂ – 20% CO₂, que mesmo com contagens mais baixas apresenta a mesma tendência do desenvolvimento dos micro-organismos estudados. A atmosfera de 100% CO₂ difere-se das demais por apresentar uma contagem bacteriana constante ao longo do tempo.

De Lima (2014) observou os mesmos padrões em estudo realizado com mariscos embalados em diferentes atmosferas modificadas, onde a embalagem com maior concentração de CO₂ foi a que obteve menor crescimento de mesófilos aeróbios e psicrotróficos.

4.4 Análise presuntiva de *Vibrio* spp.

O tratamento térmico aplicado se mostrou efetivo na inativação de *Vibrio* spp., onde amostras *in natura* foram analisadas e apresentaram crescimento de colônias suspeitas para *Vibrio parahaemolyticus* (colônias verdes) como para *Vibrio cholerae* (colônias amarelas), nas diluições 10⁻¹, 10⁻² e 10⁻³. Porém, não foram realizadas confirmações bioquímicas das mesmas. Contudo, nas amostras embaladas em ar, 80% N₂ – 20% CO₂ e 100% CO₂ não houve crescimento de colônias nas placas, pois as amostras de ostras para as três embalagens foram submetidas ao tratamento térmico (100 °C por 15 minutos) antes do envase. Resultados também encontrados por Franco (2008).

No trabalho realizado por Saulnier et al. (2010), investigou-se quatro moluscos relacionados a surtos alimentares na França durante os anos de 2003 e 2007, onde a maioria dos patógenos isolados eram espécies de vibrios, majoritariamente em ostras *Crassostrea gigas*.

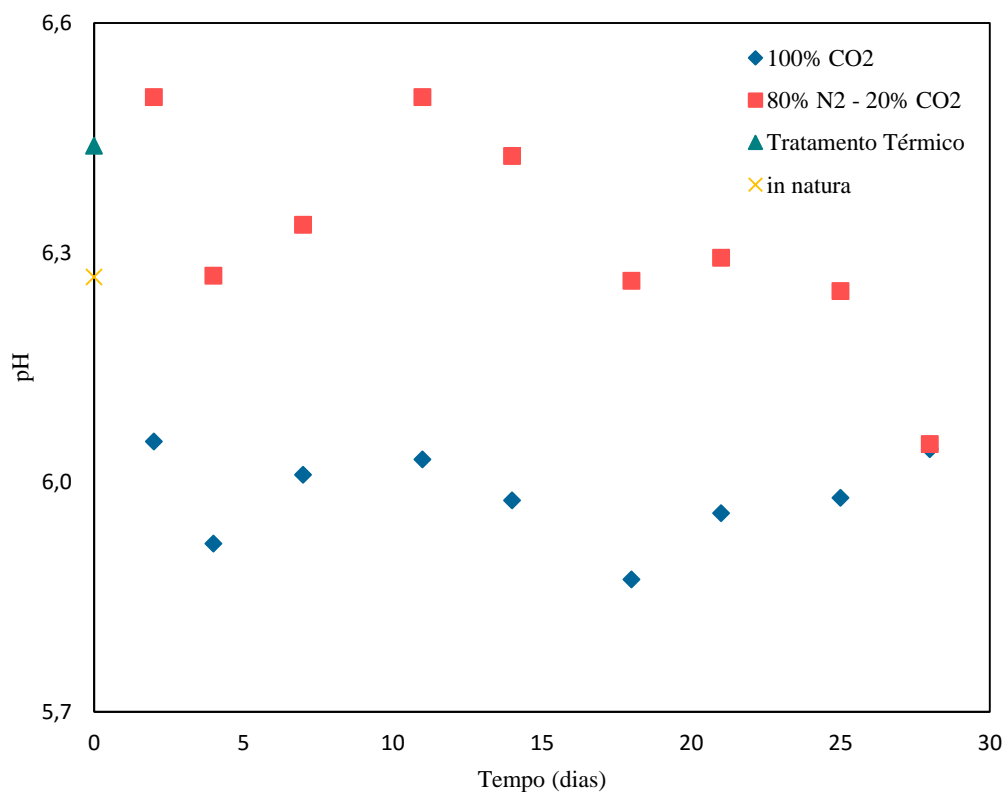
4.5 Correlação entre os parâmetros pH, composição gasosa e crescimento microbiológico

Em paralelo foram desenvolvidos estudos que avaliaram os valores de pH das amostras e a composição gasosa no *headspace* das embalagens.

A Figura 2, apresenta os valores de pH da amostra *in natura* (6,27); logo após o tratamento térmico (6,44) e durante o armazenamento. A dissolução do CO₂ no tecido corporal das ostras é percebida pelo decréscimo de pH logo no terceiro dia de armazenamento, como relatado na literatura devido a formação de ácido carbônico advindo do

dióxido de carbono, tornando a atmosfera composta por 100% CO₂ um ambiente menos favorável ao crescimento microbiológico.

Figura 2 – Evolução dos valores de pH das ostras nas embalagens contendo 80% N₂ – 20% CO₂ e 100% CO₂.



Fonte: Produção do próprio autor.

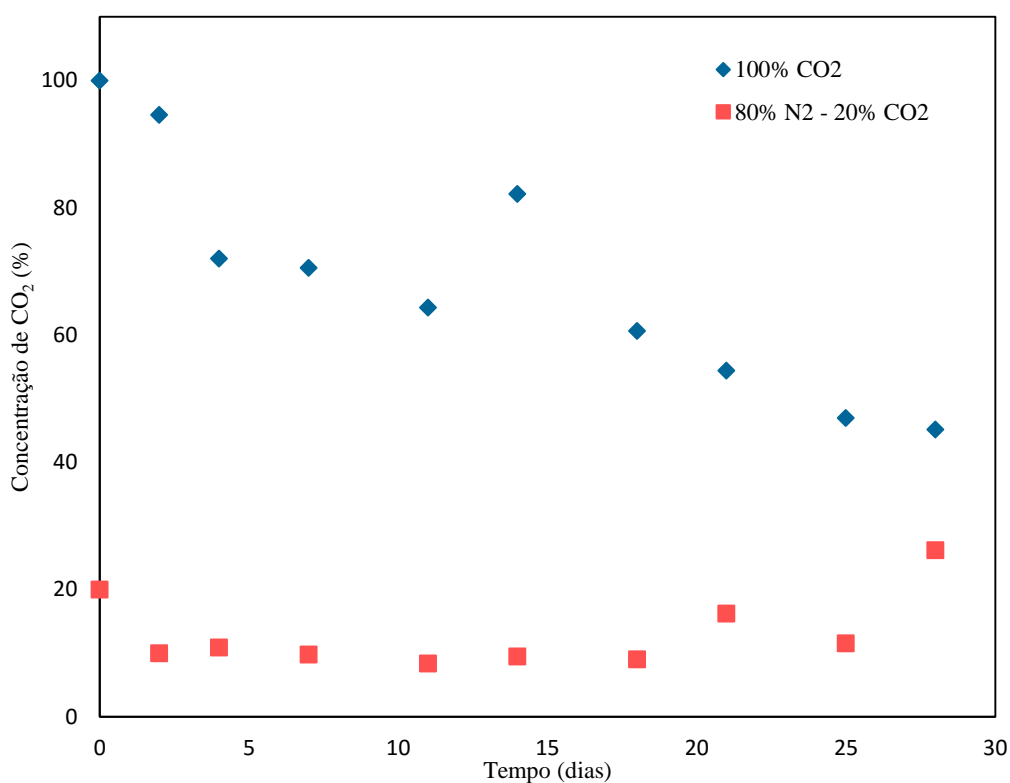
Os valores de pH correlacionaram-se com o crescimento microbiano das ostras embaladas em 80% N₂ – 20% CO₂, pois conforme o crescimento bacteriano aumenta este é capaz de alterar o pH do alimento para níveis mais baixos, causando deterioração. Já na atmosfera em 100% de CO₂, assim como, o crescimento microbiológico, os valores de pH também se mantiveram mais estáveis.

Em estudo realizado por Chen et al. (2016), ostras (*Crassostrea plicatula*) foram armazenadas a 4 °C durante 16 dias sob atmosferas modificadas de: Ar (controle), 50% CO₂ - 50% N₂, 70% CO₂ - 30% O₂, e 50% CO₂ - 50% O₂. Através de análises moleculares comprovou-se a alta diversidade microbiana encontrada em ostras, como também que sua microbiota deteriorante é variável. As análises sensoriais demonstraram que até o quarto dia as amostras não apresentavam diferença significativa e nas atmosferas em 50% CO₂ - 50% O₂

e 50% CO₂ - 50% N₂ a presença de cheiro ácido era notável. Os valores de pH variaram ao longo do tempo em todas as amostras e a contagem microbiana nas amostras controle (ar) foi maior que as demais. Os autores concluíram que a atmosfera composta por 70% CO₂ - 30% O₂ foi a mais adequada para a conservação.

A Figura 3 apresenta a concentração de CO₂ no *headspace* das embalagens de atmosfera modificada durante o armazenamento, confirmando que parte do dióxido de carbono presente na parte gasosa dissolveu-se nos tecidos das ostras.

Figura 3 – Evolução da composição gasosa no *headspace* das embalagens contendo 80% N₂ – 20% CO₂ e 100% CO₂.



Fonte: Produção do próprio autor.

Entretanto, na atmosfera composta por 80% N₂ – 20% CO₂ este efeito não é tão evidenciado, pois uma menor concentração na fase gasosa da embalagem implica em menores concentrações dissolvidas na matriz alimentícia e, consequentemente, um maior desenvolvimento microbiano. Pode-se perceber um aumento na concentração de CO₂ no *headspace* da embalagem a partir do décimo oitavo dia, justificado pelo maior desenvolvimento de bactérias, que produzem CO₂ durante a respiração celular. A partir do

décimo dia também notou-se que as embalagens estavam infladas, correlacionando-se com o crescimento microbiano evidenciado pelas análises microbiológicas.

Em sistemas com atmosfera modificada a solubilização do CO₂ no alimento provoca uma diminuição do volume livre na embalagem, fenômeno chamado de colapso da embalagem, considerado negativo do ponto de vista tecnológico (JAKOBSEN e RISBO, 2009). As atmosferas compostas por 100% de CO₂, apresentaram esse comportamento. Nas atmosferas de 80% N₂ – 20% CO₂ esse comportamento foi evitado pela alta concentração de N₂ presente.

5 CONCLUSÃO

A atmosfera modificada de 80% N₂ - 20% CO₂ foi capaz de prolongar a fase *lag* do crescimento microbiológico das bactérias mesófilas e psicrotróficas em ostras estocadas a 4 °C durante 10 dias. Entretanto foi menos eficaz que a atmosfera de 100% CO₂.

Assim, é possível afirmar que a atmosfera composta por 100% CO₂ inibiu o desenvolvimento da microbiota de ostras cozidas de forma mais eficaz quando comparada com as demais. As contagens microbiológicas das amostras em 100% CO₂ se mantiveram baixas até 28º dia de armazenamento a 4 °C.

O tratamento térmico aplicado de 100 °C por 15 minutos foi eficiente para a inativação de *Vibrio* spp. nas amostras Ar, 80% N₂ – 20% CO₂ e 100% CO₂. Nas amostras *in natura* foram detectadas colônias suspeitas de *Vibrio* spp. em meio TCBS.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Realizar análises confirmativas de *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae* e *Vibrio vulnificus*;
- Estudar outras composições e concentrações gasosas na embalagem de atmosfera modificada;
- Realizar análises sensoriais, de bases voláteis e de cor;
- Utilizar métodos moleculares para detecção e identificação dos micro-organismos, possibilitando a melhor compreensão dos mecanismos de inibição do dióxido de carbono como também os mecanismos de deterioração;
- Estudar a presença de fungos em ostras;
- Empregar outras tecnologias agregadas a atmosfera modificada, como por exemplo, utilização de antimicrobianos naturais.

7 REFERÊNCIAS

ANDRADE, G. J. P. O. Maricultura Em Santa Catarina: A Cadeia Produtiva Gerada Pelo Esforço Coordenado De Pesquisa, Extensão E Desenvolvimento Tecnológico. Florianópolis, v. 13, n. 24, p.204-217, 2016.

AZANDÉGBÉ, A.; POLY, F.; ANDRIEUX-LOYER, F.; KÉROUEL, R.; PHILIPPON, X.; NICOLAS, L. Influence of oyster culture on biogeochemistry and bacterial community structure at the sediment-water interface. *FEMS Microbiol. Ecol.* 82: 102-117, 2012.

AZEVEDO, R.V. Biofiltração e desenvolvimento da ostra *Crassostrea rhizophorae* (GUILDING, 1828) utilizando efluentes de tanque de sedimentação de cultivo do camarão *Litopenaeus vannamei* (BOONE, 1811). 57p. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Santa Cruz. Ilhéus, 2011.

BARARDI, C.R.M.; SINCERO, T.C.M.; CORREA, A.A. Contaminação de moluscos bivalves por patógenos humanos. v. 45, 2006.

BARNABÉ, G. coord. 1996. Bases biológicas y ecológicas de la Acuicultura. Edotirial Acribia, Zaragoza, 519 f. 1996.

BARNES, R. D. Zoologia dos invertebrados. 4 ed. São Paulo: Roca, p. 1179, 1984.

BARRETO, E. S. Doenças transmitidas por alimentos: *Staphylococcus aureus*. Boletim de Divulgação Técnica e Científica, Superintendência de Controle de Zoonoses, Vigilância e Fiscalização Sanitária, Rio de Janeiro, ano 2, n. 7, p. 6-7, 2000.

BARROSO, G. F.; POERSCH, L. H. DA S.; CAVALLI, R. O. Sistemas de cultivos aquícolas na zona costeira do Brasil: recursos, tecnologias, aspectos ambientais e sócio econômicos. Rio de Janeiro: Museu Nacional, 316 p. - Série Livros; 26, 2007.

BEECHAM, J. A Literature review on particle assimilation by molluscs and crustaceans. Cefas Environment Report UK, CEFAS, 2008.

BEIRÃO, H.; TEIXEIRA, E.; MEINERT, E. M. Processamento e industrialização de moluscos. In: Seminário e workshop de tecnologias para aproveitamento integral do pescado. Campinas. Anais... Campinas: ITAL, p. 38-84, 2000.

BRANDENBURG, J. S.; ZAGORY, D. Modified and Controlled Atmosphere Packaging Technology and Applications. In: YAHIA, E. M. (Ed). Modified and Controlled Atmospheres for the Storage, Transportation, and Packaging of Horticultural Commodities, CRC Press, Boca Raton, cap 4, p. 74-94, 2009.

BRASIL. RDC nº 12 de 02 de janeiro de 2001. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução. Aprova o regulamento técnico princípios gerais para estabelecimento de critérios e padrões microbiológicos para alimentos e seus anexos I, II e III. DOU, Brasília, 1 jan. 2001.

BROOKS G. F.; BUTEL, J. S.; MORSE, S. A. Microbiologia médica. In: Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA. Microbiologia médica. 21ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; p. 142-143, 2000.

BUTT, A.A.; ALDRIDGE, K.E.; SANDERS, C.V. Infections related to the ingestion of seafood. Part I. Viral and bacterial infections. Lancet Infection Diseases, v.4, n.4, p. 201-212, 2004.

CABRERA, M.E.G.; VASQUEZ, C. S.; QUINONES, E.I.R.; Serologic and molecular characterization of *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from seawater and fish products of Gulf of Mexico. Applied Environmental Microbiology, 70:6401-6406, 2004.

CAETANO, R. Zinc bioavailability of oysters (*Crassostrea gigas*) cultivated in Florianópolis / SC. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2006.

CAO, R.; XUE, C.; LIU, Q. Changes in microbial flora of Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) during refrigerated storage and its shelf-life extension by chitosan. **International Journal of Food Microbiology**; p. 272-6, 2009.

CAO, R.; XUE, C.; LIU, Q.; XUE, Y. Microbiological, chemical, and sensory assessment of Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) stored at different temperatures. **Czech J. Food Sci.** 27: 102-108, 2009.

CAO, R.; LIU, Q.; YIN, B. Z.; ZHU, L. L. Combined effect of ozonated water and chitosan on the shelf-life of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 11: 108-112, 2010.

CARTER, M. J. Enterically infecting viruses: pathogenicity, transmission and significance for food and waterborne infection. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, p. 1354-1380, 2005.

CHEN, H.; LIU, Z.; WANG, M.; CHEN, S.; CHEN, T. Characterisation of the spoilage bacterial microbiota in oyster gills during storage at different temperatures. **J. Sci. Food Agric.** 93: 3748-3754, 2013.

CHEN, H; LIU, Z; SHI, Y; DING, H. H. **Microbiological analysis and microbiota in oyster: a review.** Marine Biological Resources. Fujian, China, 2016.

CHEN, H.; WANG, M.; LIN, X.; SHI, C.; LIU, Z. Bacterial microbiota profile in gills of modified atmosphere-packaged oysters stored at 4 °C. *Food Microbiol.* 61: 58-65, 2017.

CHRISTO, W. S. Biologia reprodutiva e ecologia de ostras do gênero *Crassostrea sacco*, 1897 na Baía de Guaratuba (Paraná: Brasil): um subsídio ao cultivo. (Tese doutorado). Programa de pós-graduação em Ciências Biológicas, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 146 f. 2006.

CHURCH, N. Developments in modified-atmosphere packaging and related technologies. *Trends Food Sci Technol.* 5:345–352, 1994.

CODEX ALIMENTARIUS. Código de Práticas para Pescados e Produtos da Pesca, CAC/RCP 52-2003, v. 1, 2004.

COLWELL, R.; LISTON, J. Microbiology of shellfish. Bacteriological study of the natural flora of Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). *Appl. Microbiol.* 8: 104-109, 1960.

CORDEIRO, D.; LOPES, T.G.G; OETTERER, M.; PORTO, E.; GALVÃO, J.A. Qualidade do mexilhão *Perna perna* ao processo combinado de cocção, congelamento e armazenamento. *Boletim do CEPPA.* Curitiba, v. 25, n. 1, p. 165-179, 2007.

CORRÊA, A. A. Estudo sobre a dinâmica de depuração de ostras de cultivo (*Crassostrea gigas*) artificialmente contaminadas com *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium. Florianópolis. Dissertação [Mestrado em Biotecnologia] – Universidade Federal de Santa Catarina; 2006.

COSTA, R. A.; VIEIRA, G. H. F.; SILVA, G. C.; PEIXOTO, J. R. O; BRITO, M. V. Bactérias de interesse sanitário em sushi comercializado em Sobral – Ceará. Boletim Téc. Cient. CEPENE. Tamandaré, v. 15, n. 1, p. 15-19, 2007.

CORTINA, P. F. Comparação de metodologias para detecção de *Vibrio* spp. e o efeito no crescimento de *Vibrio parahaemolyticus* em diferentes condições de armazenamento de ostras. Dissertação. 120p. Florianópolis – SC, 2015.

COUTINHO, A. M. S. Dissertação. Influência da variação sazonal no valor nutricional e avaliação da estabilidade da ostra do sado. Leiri, Portugal, 2012.

COZZOLINO, S.M.F. Biodisponibilidade de nutrientes. Barueri, SP: Manole. p.12-37, 2005.

CRUZ-ROMERO, M.; KELLY, A.; KERRY, J. Effects of high-pressure treatment on the microflora of oysters (*Crassostrea gigas*) during chilled storage. Innov. Food Sci. Emerg. Technol. 9: 441-447, 2008.

DANIELS, J. A.; KRISHNAMURTHI, R.; RIZVI, S. S. H. **A review of effects of carbon dioxide on microbial growth and food quality.** Journal of Food Protection, v. 48(6), p. 532–537, 1985.

DALSGAARD, A. The occurrence of human pathogenic *Vibrio* spp. and *Salmonella* in aquaculture. **Int. J Food Microbiol:** 33:127-38, 1998.

DESLOUS-PAOLI J. M.; HÉRAL, M. Biochemical composition and energy value of *Crassostrea gigas* (Thunberg) cultured in the bay of Marennes-Oléron. Aquat Living Resour. [239-49 p.], 1988.

DEVLIEGHERE, F.; DEBEVERE, J.; VAN IMPE, J. Concentration of carbon dioxide in the water-phase as a parameter to model the effect of a modified atmosphere on microorganisms. **International Journal of Food Microbiology**, v. 43, p. 105-113, 1998a.

DEVLIEGHERE, F.; DEBEVERE, J. AND VAN IMPE, J. Effect of dissolved carbon dioxide and temperature on the growth of *Lactobacillus sake* in modified atmospheres. **International Journal of Food Microbiology**. 41: 231-238, 1998b.

DE LIMA, M. Aplicação do CO₂ para aumento da vida útil de mexilhão *Perna perna* (L) e *Mytillus edulis*: Processo de pré-solubilização e acondicionamento sob atmosfera modificada ativa. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.

DRIDI, S.; ROMDHANE, M. S.; ELCAFSI, M. Seasonal variation in weight and biochemical composition of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* in relation to the gametogenic cycle and environmental conditions of the Bizert lagoon, Tunisia. *Aquaculture*. 263: p. 238-48, 2007.

EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA E EXTENSÃO RURAL DE SANTA CATARINA (EPAGRI). Situação sanitária das áreas de produção de moluscos marinhos na região de abrangência do PLDM no estado de Santa Catarina. p.54, 2009.

EVANGELISTA J. Tecnologia de Alimentos. 2ª edição. Editora Atheneu, 1994.

FARIAS, H. Qualidade higiênico-sanitária na cadeia produtiva de ostras, *Crassostrea* sp., cultivadas na Baía de Guaratuba, PR, Brasil. **Mestrado**, Universidade Federal do Paraná, 2008.

FELDHUSEN, F. The role of seafood in bacterial foodborne diseases. *Microbes and infection* / Institut Pasteur, v. 2, n. 13, p. 1651-60, nov. 2000.

FERNÁNDEZ, N. T.; MAZÓN-SUÁSTEGUI, J. M.; VÁZQUEZ-JUÁREZ, R.; ASCENCIO-VALLE, F.; ROMERO J. Changes in the composition and diversity of the bacterial microbiota associated with oysters (*Crassostrea corteziensis*, *Crassostrea gigas* and *Crassostrea sikamea*) during commercial production. *FEMS Microbiol. Ecol.* 88: 69-83, 2014.

FERNANDEZ-PIQUER, J.; BOWMAN, J.; ROSS, T.; TAMPLIN, M. Molecular analysis of the bacterial communities in the live Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and the influence of postharvest temperature on its structure. **J. Appl. Microbiol.** 112: 1134-1143, 2012.

FERREIRA, J. F.; OLIVEIRA NETO, F. M. Cultivo de moluscos em Santa Catarina. SC, Brasil, UFSC, 2006.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). Inland Water Resources and Aquaculture Service (FIRI). 2006. Helm, M.M. Cultured Aquatic Species Information Programme – *Crassostrea gigas*. Cultured Aquatic Species Fact Sheets. Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em: 20 out. 2016.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). Yearbooks of Fishery Statistics Summary tables. 2007. Disponível em: <<ftp://ftp.fao.org/fi/STAT/summary/default.htm#aqua>>. Acesso em: 20 out. 2016.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). The State of World Fisheries and Aquaculture. Rome, FAO. 2010. 197p. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/013/i1820e/i1820e.pdf>>. Acesso em: 10 out. 2016.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). Fisheries and Aquaculture Technical Paper 500/1, World Aquaculture 2010. Roma, Itália, 106 p., 2011

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). Fisheries and Aquaculture Department has published the Global Aquaculture Production Statistics for the year 2011. Fisheries and Aquaculture Department. e-Bulletin, Food and Drug Organization. Roma, Itália, 2013.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). The State of World Fisheries and Aquaculture 2016. Contributing to food security e nutrition for all. Rome: Food and agriculture organization, 200p, 2016.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA) - Select Committee on GRAS Substances (SCOGS) Opinion: Carbon dioxide. Disponível em:

<www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/SCOGS/ucm261241.htm> Acesso em: 10 de nov. 2017.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). National Food Safety Programs, 2001. Disponível em: <<http://www.foodsafety.gov/~dms/fs-toc.html>>. Acesso em novembro de 2016.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATION/ INTERGOVERNMENTAL OCEANOGRAPHIC COMMISSION/WORLD HEALTH ORGANIZATION. Report of the Joint FAO/IOC/WHO ad hoc Expert Consultation on Biotoxins in Bivalve Molluscs. Noruega, p. 24, 2004. Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/biotoxin_report_en.pdf>. Acesso em: 03 de nov. 2016.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). Fisheries and Aquaculture Technical Paper 500/1, **World Aquaculture 2010**. Roma, Itália, 106 p., 2011.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). Fisheries and Aquaculture Department has published the Global Aquaculture Production Statistics for the year 2011. Fisheries and Aquaculture Department. e-Bulletin, Food and Drug Organization. Roma, Itália, 2013.

FRANCO, B. D. G. de M. Microbiologia dos alimentos. São Paulo: Editora Atheneu, 2008.

GALVÃO, J.A. Qualidade microbiológica da água de cultivo e de mexilhões *Perna perna* (Linnaeus, 1758) comercializados em Ubatuba, SP. 2004. Dissertação de Mestrado. Escola Superior de Agricultura Luís de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo, 2004.

GANDRA, E. A.; GANDRA, T. K. V.; MELLO, W. S. DE; GODOI, H. S. Técnicas moleculares aplicadas à microbiologia de alimentos. Acta Sci. Technol. Maringá, v. 30, n. 1, p. 109-118, 2008.

GARRIDO, A.; CHAPELA, M.; FERREIRA, M.; ATANASSOVA, M.; FAJARDO, P.; LAGO, J.; CABADO, A. G. Development of a multiplex real-time PCR method for pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* detection (tdh+ and trh+). Food Control, v. 24, p 128-135, 2012.

GENIGEORGIS, C. A. Microbial and safety implications of the use of modified atmosphere to extend the storage life of fresh meat and fish. **International Journal of Food Microbiology**, v.1, n.5, p.237-251, 1985.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S.; OLIVEIRA, C. A. S. Aspectos da qualidade do pescado de relevância em saúde pública. *Revista Higiene Alimentar*, n. 53, v. 12, p.30-37, 1998.

GIBOTTO, A.; SARADAKIS, H.O.; PELAYO, J.S.; TAGLIARI, K.C.; FALCÃO, D.P. Prevalence and virulence properties of *Vibrio cholera* non-01, *Aeromonas* spp. and *Plesiomonas shigelloides* isolated from Cambé Stream (Paraná, Brazil). **Journal Applied Microbiology**, v.89, p. 70-75, 2000.

GOMES, L.A.O. Cultivo de Crustáceos e Moluscos. Nobel, São Paulo. 226 pp, 1986.

GONZALEZ-ACOSTA, B.; BASHAN, Y.; HERNANDEZ-SAAVEDRA, N.Y.; ASCENCIO, F.; DE LA CRUZ-AGÜERO, G. Seasonal seawater temperature as the major determinant for populations of culturable bacteria in the sediments of an intact mangrove in an arid region. *FEMS Microbiol. Ecol.* 55(2), 311-321, 2006.

GOULAS, A.E.; KONTOMINAS, M.G. Effect of modified atmosphere packaging and vacuum packaging on the shelf-life of refrigerated chub mackerel (*Scomber japonicus*): biochemical and sensory attributes. *Eur. Food Res. Technol.*, 224: 545–553, 2007.

GRAM, L.; HUSS, H. H. Microbiological spoilage of fish and fish products. **International Journal of Food Microbiology**, 33 (1): p. 121-37, 1996.

GROBBEL, J. P.; DIKEMAN, M. E.; HUNT, M. C.; MILLIKEN, G. A. Effects of different packaging atmosphere and injection-enhancement on beef tenderness, sensory attributes, desmin degradation, and display color. **Jornal Anim. Sci.** 86:2697–2710, 2008.

HAAS, G.J.; PRESCOTT, H. E.; DUDLEY, E.; DIK, R.; HINTLIAN, C.; KEANE, L. Inactivation of microorganisms by carbon dioxide under pressure. **Journal of Food Safety**, v. 9, p. 253–265, 1989.

HERNÁNDEZ-ZÁRATE, G.; OLMOS-SOTO, J. Identification of bacterial diversity in the oyster *Crassostrea gigas* by fluorescent in situ hybridization and polymerase chain reaction. **J. Appl. Microbiol.** 100: 664-672, 2006.

HUSS, H. H. Garantia da qualidade dos produtos da pesca - Food and Agriculture Organization. Documento Técnico sobre a Pesca. Roma: FAO, n. 334, 176 p., 1997.

IMAI, T. Aquaculture in shallow seas: Progress in shallow sea culture. New Delhi: A. A. Balkema/Rotterdam. 615p, 1982.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMSF). Ecologia Microbiana de los Alimentos. vol. 2. Zaragoza, Espanha, p.573-608, 1985.

IWAMOTO, M.; AYERS, T.; MAHON, B. E.; SWERDLOW, D. L. Epidemiology of Seafood-Associated Infections in the United States. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 23, n. 2, p. 399–411, 2010.

JAKOBSEN, M.; BERTELSEN, G. Predicting the amount of carbon dioxide absorbed in meat. **Meat Science**. V. 68, p. 603-610. 2004.

JAKOBSEN, M.; BERTELSEN, G. Solubility of carbon dioxide in fat and muscle tissue. **Journal of Muscle Foods**. v. 17, p. 9-19, 2006.

JAY, James M. Microbiologia de alimentos / James M. Jay; trad. Eduardo Cesar Tondo [et al.] – 6. ed. – Porto Alegre: Artmed, 2005.

JAYASINGH, P.; CORNFORTH, D. P.; BRENNAND, C. P.; CARPENTER, C. E.; WHITTIER, D. R. Sensory evaluation of ground beef stored in high-oxygen modified atmosphere packaging. **J. Food Sci.** 67:3493–3496, 2002.

KERRY, J. P.; O'GRADY, M. N.; HOGAN, S. A. **Past, current and potential utilisation of active and intelligent packaging systems for meat and muscle-based products: A review.** *Meat Science*, v. 74, p. 113–130, 2006.

KIMURA, I.; OHMINAMI, H.; OKUDA, H. Effects of extract of oyster on lipid metabolism in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 59, p. 117-123, 1998.

KING, G. M.; JUDD, C.; KUSKE, C. R.; SMITH, C. Analysis of stomach and gut microbiomes of the Eastern oyster (*Crassostrea virginica*) from Coastal Louisiana, USA. **PLOS ONE** 7(12), e51475, 2012.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P. C. Diagnóstico microbiológico: 6ª edição Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

KUSUMANINGRUM, H. D.; RIBOLDI, G.; HAZELEGER, W. C.; BEUMER, R. R. Survival of foodborne pathogens on stainless steel surfaces and cross-contamination to foods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 85, n. 3, p. 227-236, 2003.

LA VALLEY, K. J.; JONES, S.; GOMEZ-CHIARRI, M.; DEALTERIS, J.; RICE, M. Bacterial community profiling of the eastern oyster (*Crassostrea virginica*): comparison of culture-dependent and culture independent outcomes. **J. Shellfish Res.** 28: 827-835, 2009.

LEE, J.K.; JUNG, D. W.; EOM, S. Y.; OH, S. W.; KIM, Y.; KWAK, H. S.; KIM, Y. H. Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* in oysters from Korean retail outlets. **Food Control**, v. 19, n. 10, p. 990-994, 2008.

LENOCH, R. Saúde pública e os moluscos marinhos cultivados. *Revista Conselho Federal de Medicina Veterinária* v. 29, p. 65-70, 2003.

LEON, G. et al. Modified-atmosphere packaging of produce. In: RAHMAN, S. **Handbook of food preservation**. 1999.

LI, Y.; QIN, J.G.; LI, X.; BENKENDORFF, K. Monthly variation of condition index, energy reserves and antibacterial activity in Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, in Stansbury (South Australia). *Aquaculture*; 286 (1-2): p. 64-71, 2009.

LIN, H. M.; YANG, Z. Y.; CHEN, L. F. Inactivation of *Leuconostoc dextranicum* with carbon dioxide under pressure. **Chemical Engineering Journal and the Biochemical Engineering Journal**, v. 52, p. 29–34, 1993.

LINTON, M.; MC CLEMENTS, J. M. J.; PATTERSON, M. F. Changes in the microbiological quality of shellfish, brought about by treatment with high hydrostatic pressure. **Int. J. Food Sci. Technol.** 38: 713-727, 2003.

LIU, C.; LU, J.; SU, Y-C. Effects of flash freezing, followed by frozen storage, on reducing *Vibrio parahaemolyticus* in Pacific raw oysters (*Crassostrea gigas*). **J. Food Prot.** 72: 174-177, 2009.

LOSS, C. R.; HOTCHKISS, J. H. Use of dissolved carbon dioxide to extend the shelf-life of dairy products. Dairy Processing. Cornell University, USA. Published by Woodhead Publishing Limited Abington Hall, Abington Cambridge CB1 6AH England. v. 1, p. 391–410, 2003.

LOURENÇO, J. I. R. Implementação da técnica de PCR em tempo real na detecção de *Vibrio parahaemolyticus* em alimentos. Dissertação de Mestrado. Escola Superior Agrária de Santarém, Portugal, 2011.

LUCENA, R. F.; DELAMARE, A. P. L.; THOMAZI, G.; FERRARINI, S.; ZACARIA, J.; ECHEVERRIGARAY, S. *Aeromonas* detection and characterization using genus-specific PCR and single-strand conformation polymorphism (SSCP). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. 28 (8): 3007-3013, 2012.

MADIGAN, T. L.; BOTT, N. J.; TOROK, V. A.; PERCY, N. J.; CARRAGHER, J. F.; LOPES, M. A. B. A microbial spoilage profile of half shell Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) and Sydney rock oysters (*Saccostrea glomerata*). **Food Microbiol.** 38: 219-227, 2014.

MANCINI, R.A.; HUNT, M. C. **Current research in meat color: Review.** *Meat Sci.*;71:100–121, 2005.

MANGARAJ, S.; GOSWAMI, T. K.; MAHAJAN, V. **Applications of Plastic Films for Modified Atmosphere Packaging of Fruits and Vegetables: A Review.** *Food Engineering Reviews*, New York, v. 1, n. 2, p. 133 - 158, 2009.

MASSAGUER, P. R. DE. Microbiologia dos processos alimentares. Editora Varela. São Paulo, 2005.

MAZIERO, M. T. Contaminação de carcaças de frango por *Campylobacter jejuni* antes e após armazenamento sob resfriamento ou congelamento. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Departamento de Ciências e Tecnologia de Alimentos, Universidade de Estadual de Londrina, Londrina, p. 56-92, 2007.

MCLAUGHLIN, J. C. *Vibrio*. In: JOBARON, E. et al. (ed). Manual of clinical microbiology. Washington, D.C.: American Society for Microbiology. V. 35. p 465–76, 1995.

MCMILLIN, K. W. **Where is MAP Going? A review and future potential of modified atmosphere packaging for meat.** Meat Science, Essex , v. 8, n. 1, p. 43- 65, 2008.

MEREDITH, H.; VALDRAMIDIS, V.; ROTABAKK, B. T.; SIVERTSVIK, M.; MCDOWELL, D.; Bolton, D. J. Effect of different modified atmospheric packaging (MAP) gaseous combinations on *Campylobacter* and the shelf-life of chilled poultry fillets. Food Microbiology, p. 44, v. 196-203, 2014.

MILNE, D.; POWELL, S. M. Limited microbial growth in Atlantic salmon packed in a modified atmosphere. Food Control, Australia, 2014.

MIOTTO, L. A. Coliformes termotolerantes e *Enterococcus* sp em ostras e águas salinas utilizadas para cultivo de moluscos bivalves na Baía Sul da Ilha de Santa Catarina, Santa Catarina - Brasil. 106f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, 2009.

MIOTTO, M. Recomendações para um programa de Boas Práticas de Fabricação aquícolas em cultivos de ostras (*Crassostrea gigas*). Universidade Federal de Santa Catarina- Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos. p. 41, 2012.

MIZUTA, D. D. Contribuição do estudo oceanográfico para a produção comercial de ostras *Crassostrea gigas*: estudo de caso da Baía Sul, Ilha de Santa Catarina, SC. 2010. Dissertação (Mestrado). Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo. São Paulo, p. 126, 2010.

MONTANHINI, M. T. M.; NETO, R. M. Changes in the microbiological quality of mangrove oysters (*Crassostrea brasiliiana*) during different storage conditions. **J. Food Prot.** 78: 164-171, 2015.

MORAES, I. R.; MASTRO, N. L.; JAKABI, M.; GELLI, D. S. Estudo da radiosensibilidade ao 60CO do *Vibrio cholerae* O1 incorporado em ostras. Revista de Saúde Pública, São Paulo, v. 34, n° 1, 2000.

MURRAY, J.; BURT, J. R. The Composition of Fish. FAO, 2001; Disponível em: <<http://www.fao.org/wairdocs/tan/x5916e/x5916e00.htm>>

NASCIMENTO, S. M. M.; VIEIRA, R. H. S. F.; THEOPHILO, G. N. D. *Vibrio vulnificus* as a health hazard for shrimp consumers. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo 43:263-266, 2001.

ORBAN, E.; LENA, G. D.; MASCI, M.; NEVIGATO, T.; CASINI, I.; CAPRONI, R.; GAMBELLI, L.; PELLIZZATO, M. Growth, nutritional quality and safety of oysters (*Crassostrea gigas*) cultured in the lagoon of Venice (Italy). **Journal of the Science of Food and Agriculture**; 84 (14): p. 1929-38, 2004.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA ALIMENTAÇÃO E AGRICULTURA. Departamento de Pesca e Aquicultura. World aquaculture 2010. Roma, FAO 2011.

OGAWA, M.; MAIA, E. L. Manual de Pesca – Ciência e Tecnologia do Pescado, São Paulo: Livraria Varela, 430 p, 1999.

PANORAMA DA AQUICULTURA, Panorama da Malacocultura Brasileira. Panorama da Aquicultura. v.11, n.64, p. 25-31, 2001.

PARISENTI, J.; TRAMONTE, V. L. C. G.; ARELLANO, D. B. Composição de esteróis e ácidos graxos de ostras (*Crassostrea gigas*) cultivadas em Florianópolis – SC, em duas estações do ano. Ciência e Tecnologia de Alimentos. Campinas, 30(Supl.1): 73-76, 2010.

PARRY, R. T. Envasado de los alimentos en atmósfera modificada. Madrid: A Madrid Vicente, 541p, 1993.

PARVEEN, S.; HETTIARACHCHI, K.A.; BOWERS, J.C.; JONES, J.L.; TAMPLIN, M.L.; MCKAY, R.; BEATTY, W.; BROHAWN, K.; DASILVA, L.V.; DEPAOLA, A. Seasonal distribution of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake Bay oysters and waters. **Int. J. Food Microbiol.** 128(2), 354-361, 2008.

PATSIAS, A.; CHOULIARA, I.; BADEKA, A.; SAVVAIDIS, I. N.; KONTOMINAS, M. G. Shelf-life of a chilled precooked chicken product stored in air and under modified atmospheres: microbiological, chemical, sensory attributes. *Food Microbiology*, v. 23, p. 423-429, 2006.

PAUL, D. R.; CLARKE, R. Modeling of modified atmosphere packaging based on designs with a membrane and perforations. **Journal of Membrane Science**, Amsterdam, v. 208, n. 1-2, p. 269-283, 2002.

PEDROSA, L.F.C.; COZZOLINO, S.M.F. Composição centesimal e de minerais de mariscos crus e cozidos da cidade de Natal/RN. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v.21(2), p.154-157, 2001.

PEREIRA, C. S. A cultura de mexilhões na Baía de Guanabara e suas implicações para a Saúde Pública – Contexto político-social e microbiológico. Tese (Doutorado em Saúde Pública). Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2003.

PEREIRA, C. S.; VIANA, C. M.; RODRIGUES, D. P. *Vibrio parahaemolyticus* produtores de urease isolados a partir de ostras (*Crassostrea rizophorae*) coletadas in natura em restaurantes e mexilhões (*Perna perna*) de banco natural. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. Campinas, v. 24, n. 4, p. 591-595, 2004.

PEREIRA, M.A.; NUNES, M.M.; NUERNBERG, L.; SCHULZ, D.; BATISTA, C.R.V. Microbiological quality of oysters (*Crassostrea gigas*) produced and commercialized in the coastal region of Florianópolis – Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.37, p.159-63, 2006.

PHILLIPS, C. A. **Review: Modified Atmosphere Packaging and its effects on the microbiological quality and safety of produce.** *International Journal of Food Science and Technology*, Oxford, v. 31, n. 6, p. 463-479, 1996.

POLI, C. R. Cultivo de ostras do Pacífico (*Crassostrea gigas*, 1852). In: POLI, C.R.; POLI, A.T.B.; ANDREATTA, E.; BELTRAME, E. Aquicultura: Experiências Brasileiras. Florianópolis –SC. p.251-266, 2004.

PORTELLA, C. D. G. Avaliação da qualidade da ostra nativa *Crassostrea brasiliana* congelada em concha em função da composição química e análise sensorial. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Aquicultura. Universidade Estadual Paulista —Júlio de Mesquita Filho, 2005.

POWELL, S. M.; RATKOWSKY, D. A.; TAMPLIN, M. L. Predictive model for the growth of spoilage bacteria on modified atmosphere packaged Atlantic salmon produced in Australia. Food Microbiol, 2015.

PRAPAIWONG, N.; WALLACE, R. K.; ARIAS, C. R. Bacterial loads and microbial composition in high pressure treated oysters during storage. **Int. J. Food Microbiol.** 131: 145-150, 2009.

PRUZZO, C. Pathogenic *Vibrio* Species in the Marine and Estuarine Environment. In: BELKIN, S.S.; COLWELL, R.R. Oceans and Health: Pathogens in the Marine Environment. New York: Springer, p. 217-252, 2005.

PUJALTE, M. J.; ORTIGOSA, M.; MACIÁN, M. C.; GARAY, E. Aerobic and facultative anaerobic heterotrophic bacteria associated to Mediterranean oysters and seawater. **Int. Microbiol.** 2: 259-266, 1999.

QUEIROZ, C. Cultivo de Ostras. Florianópolis, 25p, 1990.

RAMOS, R. J. Monitoramento bacteriológico de águas do mar e ostras (*Crassostrea gigas*) em áreas de cultivo na baía Sul da Ilha de Santa Catarina. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, Santa Catarina, p. 86, 2007.

RAMOS, R. J.; MIOTTO, L. A.; MIOTTO, M.; SILVEIRA JUNIOR N.; CIROLINI, A.; SILVA, H. S.; RODRIGUES D. DOS P.; VIEIRA, C. R. Occurrence of potentially pathogenic *Vibrio* in oysters (*Crassostrea gigas*) and waters from bivalve mollusk cultivations in the South Bay of Santa Catarina. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. May-Jun; 47(3):327-33, 2014.

REN, J. S.; MARSDEN, I. D.; ROSS, A. H.; SCHIEL, D. R. Seasonal variation in the reproductive activity and biochemical composition of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) from the Marlborough Sounds, New Zealand. **New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research**; 37: p. 171-82, 2003.

RHODES, M. W.; H. KATOR. Survival of *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. in estuarine environments. *Appl. Environ. Microbiology*, v. 54, n.12, p. 2902–2907, 1988.

RICHARDS, G. P.; WATSON, M. A.; CRANE, E. J.; BURT, I. G.; BUSHEK, D. *Shewanella* and *Photobacterium* spp. in Oysters and Seawater from the Delaware Bay. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 3323-3327, 2008.

RODRIGUES, S. M. A.; GONÇALVES, E. G. R.; MELLO, D. M.; OLIVEIRA, E.G.; HOFER, E. Pesquisa de bactérias do gênero *Vibrio* em feridas cutâneas de pescadores do município de Raposa - MA. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 34: 407-411, 2001.

RODRIGUES, B. L.; DA SILVEIRA, T. A.; SAMPAIO, G. S. L.; CABRAL, C. C.; ARAUJO, J. V. A.; FRANCO, R. M.; JUNIOR, C. A. C. Influence of vacuum and modified atmosphere packaging in combination with UV-C radiation on the shelf life of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets. *Food Control*. 2016.

ROTABAKK, B. T.; WYLLER, J.; LEKANG, O. I.; SIVERTSVIK, M. A mathematical method for determining equilibrium gas composition in modified atmosphere packaging and soluble gas stabilization systems for non-respiring foods. **Journal of Food Engineering**, v. 85, p. 479-490, 2008a.

ROTABAKK, B. T.; BIRKELAND, S.; LEKANG, O. I.; SIVERTSVIK, M. Enhancement of modified atmosphere packaged farmed Atlantic Halibut (*Hippoglossus Hippoglossus*) fillet quality by soluble gas stabilization. **Food Science and Technology International**, v. 14(2), p. 179-186, 2008b.

ROTERMAN, Y. R.; BENAYAHU, Y.; RESHEF, L.; GOPHNA, U. The gill microbiota of invasive and indigenous *Spondylus* oysters from the Mediterranean Sea and northern Red Sea. *Environ. Microbiol. Rep.* 7: 860-867, 2015.

RUPP, G.S. Introdução à biologia das ostras. In: FERREIRA, J.F. et al. Cultivo de ostras. Laboratório de cultivo de moluscos marinhos. Florianópolis. p. 15-24, 1999.

SANTOS, J.J. Aspectos da ecologia e biologia da ostra *Crassostrea rhizophorae* (Guilding 1828) na Baía de Todos os Santos. 166f. Tese (Doutorado em Zoologia) Instituto Biológico, Universidade do Estado de São Paulo. São Paulo, 1978.

SANTOS, A. A. DOS; NOVAES, A. L.T.; MULLER, F.; RUPP, G. S.; VENTURA, R. Síntese informativa da maricultura 2009. Epagri/Cedap. Florianópolis, 2010.

SANTOS, A. A. DOS; NOVAES, A. L. T.; SILVA, F. M.; SOUZA, R. V. DE; COSTA, S. W. DA. Síntese informativa da maricultura 2011. Florianópolis: [s.n.], 2012.

SANTOS, A. A. DOS; COSTA, S. W. DA; Síntese informativa da maricultura 2015. Florianópolis: [s.n.], 2016.

SAULNIER, D.; DECKER, S.; HAFFNER, P.; COBRET, L.; ROBERT, M.; GARCIA, C. A large-scale epidemiological study to identify bacteria pathogenic to Pacific oyster *Crassostrea gigas* and correlation between virulence and metalloprotease-like activity. Microb. Ecol. 59: 787-798, 2010.

SCHIRMER, B. C.; LANGSRUD, S. A dissolving CO₂ headspace combined with organic acids prolongs the shelf-life of fresh pork, Meat Science, v. 85, p. 280-284, 2010.

SEBRAE, Programa AquiNordeste. Projeto de Integração e Fortalecimento da Cadeia Produtiva da Aquicultura da Região Nordeste do Brasil. Relatório Final; Sebrae. Brasília, 2015.

SEYFERT, M.; HUNT, M.C.; MANCINI, R. A.; KROPF, D. H.; STRODA, S. L. Internal premature browning in cooked steaks from enhanced beef round muscle packaged in high oxygen and ultra-low oxygen modified atmosphere. J Food Sci. 69:142–146, 2004.

SHEN, X.; CAI, Y.; LIU, C.; LIU, W.; HUI, Y.; SU, Y.C. Effect of temperature on uptake and survival of *Vibrio parahaemolyticus* in oysters (*Crassostrea plicatula*). **Int. J. Food Microbiol.** 136(1), 129-132, 2009.

SILVA, N. da. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água. 5ª ed. – São Paulo : Blucher, 560p, 2017.

SIVERTSVIK, M.; BIRKELAND, S. Effects of soluble gas stabilization, modified atmosphere, gas to product volume ratio and storage on the microbiological and sensory characteristics of ready-to-eat shrimp (*Pandalus borealis*). *Food Science and Technology International*, v.12 (5), p. 445-454, 2006.

SIVERTSVIK, M.; JEKSRUD, W. K.; VAGANE, A.; ROSNES, J. T. Solubility and absorption rate of carbon dioxide into non-respiring foods. Part 1: Development and validation of experimental apparatus using a manometric method. **Journal of Food Engineering**, v. 61(3), p. 449-458, 2004a.

SIVERTSVIK, M.; ROSNES, J. T.; JEKSRUD, W. K. Solubility and absorption rate of carbon dioxide into non-respiring foods. Part 2: Raw fish fillets. **Journal of Food Engineering**, v. 63, p. 451-458, 2004b.

SIVERTSVIK, M.; ROSNES, J. T.; KLEIBERG, G. H. Effect of modified atmosphere packaging and superchilled stored on the microbial and sensory quality of atlantic salmon (*Salmo salar*) fillets. **Journal of Food Science**, v. 68, p. 1467-1472, 2003.

SIVERTSVIK, M.; JEKSRUD, K.; ROSNES, T. **A review of modified atmosphere packaging of fish and fishery products – significance of microbial growth, activities and safety**. *International Journal of Food Science and Technology*, v. 37, p. 107-127, 2002.

SIVERTSVIK, M.; ROSNES, J. T.; BERGSLIEN, H. Modified atmosphere packaging. In: OHLSSON, T.; BENGTTSSON, N. (Eds.). *Minimal Processing Technologies in the Food Industry*. Cambridge: Woodhead publishing. cap. 4, p 61- 87, 2002.

SOCOL, M. C. H.; OETTERER, M. Use of modified atmosphere in seafood preservation. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 46, n.4, p.569-580, 2003.

SOUZA FILHO, J. Custo de produção da ostra cultivada. Florianópolis: Instituto Cepa/SC. 23 p, 2003.

SOUZA, R. V. DE; PETCOV, H. F. D. Comércio legal de moluscos bivalves. Florianópolis, SC; Epagri, Boletim Didático, nº95, 2013.

SOUZA, R. V. de; RUPP, G. S.; CAMPOS, C. J. A. de; LEE, R. Moluscos bivalves: medidas de controle microbiológico para atender às exigências da União Europeia. Florianópolis: Epagri, 48p, 2014.

STAMMEN, K.; GERDES, D.; CAPORASO, F. Modified atmosphere packaging of seafood. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.29, n.5, p.301-331, 1990.

SU, Y.; LIU, C. *Vibrio parahaemolyticus*: A concern of seafood safety. Food microbiology. v. 24, p. 549-558, 2007.

SUBASINGHE, R.P. Aquaculture future: an analysis. FAO Aquaculture Newsletter, v. 52, p. 19-23, 2014.

SUBRAMANIAM, P. J. Dairy foods, multi-component products, dried foods and beverages. In: Principles and Applications of Modified Atmosphere Packaging of Food, B. A. Blackistone, ed, p. 158-193, 1998.

TEPLITSKI, M.; WRIGHT, A. C.; LORCA, G. Bacterial approaches for controlling shellfish-associated pathogens. **Current opinion on Biotechnology**, v.20, p.1-6, 2009.

THOMPSON, F.L.; IIDA, T.; SWINGS, J. Biodiversity of vibrios. Microbiology Molecular Biology. Review.v.68, p.403-432, 2004.

THOMPSON, F. L.; SWINGS, J. Taxonomy of the Vibrios. In: THOMPSON, F. L.; AUSTIN, B.; SWINGS, J. (Eds.). The Biology of Vibrios. Whashington: American Society for Microbiology, p. 29-43, 2006.

THUNBERG. *Crassostrea gigas*. World Register of Marine Species, 1793.

TORTORA, G. J; FUNKE, B. R; CASE, C. L. Microbiologia: Doenças Microbianas do Sistema Digestivo. Porto Alegre: Artmed Editora S/A, Ed 8, cap. 25, p. 705-709, 2005.

TRABAL, N.; MAZÓN-SUÁSTEGUI, J. M.; VÁZQUEZ-JUÁREZ, R.; ASENCIO-VALLE, F.; MORALES-BOJÓRQUEZ, E.; ROMERO, J. Molecular analysis of bacterial microbiota associated with oysters (*Crassostrea gigas* and *Crassostrea corteziensis*) in different growth phases at two cultivation sites. *Microb. Ecol.* 64: 555-569, 2012.

USDA – United States Department of Agriculture. Nutrient database for Standard Reference. Disponível em:

<https://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/4709?fgcd=Finfish+and+Shellfish+Products&manu=&facet=&format=&count=&max=50&offset=200&sort=fd_s&order=asc&qlookup=&ds=Standard+Reference&qt=&qp=&qq=&qn=&q=&ing=> Acesso em: 25 de ago. 2016.

USDA – United States Department of Agriculture. Nutrient database for Standard Reference. Disponível em:

<https://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/4709?fgcd=Finfish+and+Shellfish+Products&manu=&facet=&format=&count=&max=50&offset=200&sort=fd_s&order=asc&qlookup=&ds=Standard+Reference&qt=&qp=&qq=&qn=&q=&ing=>. Acesso em: 02 de nov. 2017.

VIEIRA, R. H. S. F.; Microbiologia, higiene e qualidade do pescado: teoria e prática. São Paulo: Livraria Varela. 380 p, 2004.

VIEIRA R. H. S.F.; LIMA, E.A.; SOUSA, D. B. R.; REIS, E. M. F.; COSTA, R.G.; RODRIGUES, D. P. *Vibrio* spp. and *Salmonella* spp. presence and susceptibility in crabs *Ucides cordatus*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 46: 179-182, 2004.

VIEIRA, R. H. S. F. Kanagawa-Negative, tdh- and trh-positive *Vibrio parahaemolyticus* isolated from fresh oysters marketed in Fortaleza, Brazil. *Current Microbiology*, v. 63, p. 126-130, 2011.

VINATEA, L. Aquicultura e desenvolvimento sustentável. Subsídios para a formulação de políticas de desenvolvimento da aquicultura brasileira. Florianópolis: UFSC. 310p, 1999.

WALNE, P. Culture of bivalve molluscs: 50 years experience in Conwy. The Buckland Foundation, Surrey, 189pp, 1979.

WANG, T.; SVEINSDÓTTIR, K.; MAGNÚSSON, H.; MARTINSDÓTTIR, E. Combined application of modified atmosphere packaging and superchilled storage to extend the shelf life of fresh cod (*Gadus morhua*) Loins. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 73, n. 1, p. s11-s19, 2008.

WANG, D.; ZHANG, Q.; CUI, Y.; SHI, X. Seasonal dynamics and diversity of bacteria in retail oyster tissues. **Int. J. Food Microbiol.** 173: 14-20, 2014.

WAY, C.W.V. Segredos em Nutrição: respostas necessárias ao dia-a-dia em rounds, na clínica, em exames orais e escritos. Porto Alegre: Artmed, 296p, 2000.

WEI, C.I.; BALABAN, M.O.; FERNANDO, S.Y.; PELOW, A.J. Bacterial effect of high pressure CO₂ treatment on foods spiked with *Listeria* or *Salmonella*. **Journal of Food Protection**, v. 54, p. 189–193, 1991.

WOLFE, S. H. Use of CO₂ and CO₂ enriched atmospheres for meats, fish, and produce. *Food Technology*, v. 29, p. 55–58, 1980.

WOOD, R. R.; ARIAS, C. R. Dynamics of bacterial communities in postharvested Eastern oyster (*Crassostrea virginica*) maintained under refrigeration. **J. Aquat. Food Prod. Technol.** 24: 300-312, 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION / FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATION / INTERGOVERNMENTAL OCEANOGRAPHIC COMMISSION. Report of the Joint FAO/IOC/WHO ad hoc Expert Consultation on Biotoxins in Bivalve Molluscs. Noruega, p. 24, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) / FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. Risk assessment of *Vibrio vulnificus* in raw oysters: interpretative summary and technical report. WHO: Genebra, n. 8, p. 135, 2005.

YOUNGER, A.D.; LEE, R. J.; LEES, D.N. Microbiological monitoring of bivalve mollusc harvesting areas in England and Wales – rationale and approach. *Molluscan Shellfish Safety*. Galicia: Grafinova S.A., p. 265-277, 2003.

YUAN, J. T. C. Modified Atmosphere Packaging for Shelf-Life Extension. In: NOVAK, J. S.; SAPERS, G. M.; JUNEJA, V. K. (Eds.). *Microbial Safety of Minimally Processed Foods*. Boca Raton: CRC Press. cap. 10, p. 205-220, 2003.

ZAKRYS, P. I.; HOGAN, S. A.; O'SULLIVAN, M. G.; ALLEN, P.; KERRY, J. P. Effects of oxygen concentration on the sensory evaluation and quality indicators of beef muscle packed under modified atmosphere. *Meat Sci.* 79:648–655, 2008.

ZUREL, D.; BENAYAHU, Y.; OR, A.; KOVACS, A.; GOPHNA, U. Composition and dynamics of the gill microbiota of an invasive Indo-Pacific oyster in the eastern Mediterranean Sea. *Environ. Microbiol.* 13: 1467-1476, 2011.